

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Genotipificación y subtipificación de *Clostridium perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

David Remy Pérez Janampa

Lima – Perú

2006

*A David y Sonia, mis padres.*

El presente estudio fue realizado en la Unidad de Virología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el financiamiento de las siguientes instituciones:



**CONOPA**



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Raúl Rosadio, al Dr. Lenin Maturrano y a la Dra. Jane Wheeler por la confianza depositada sobre mí.

A la Estación Experimental IVITA-Maranganí, al fundo alpaquero privado, a las comunidades alpaquera de Ccaicco y Picotani, y a la familia Tijeras, por todas las facilidades brindadas durante el muestreo.

A Alvaro Veliz, Hugo Castillo, Vanya Montenegro, Erick Cirilo, Victor Cano y Juan Olazábal, por su apoyo incondicional en la toma de muestras.

A la unidad de Bacteriología, en especial a Siever Morales, por su sincera amistad y enseñanzas en el campo de la bacteriología.

Al Dr. Alfonso Chavera y a la Dra. Rosa Perales por su paciencia y valioso apoyo en la interpretación de lesiones histopatológicas.

A Sandra Rosenthal, mi gran amiga y pareja.

A mis mejores amigos Mario Vargas, Alex Oscanoa y Cristian Flores por ser como son...patas.

A mis compañeros de laboratorio: Katherine Yaya, Luis Llanco, Pablo Londoño, Jesús Chávez y Lady Cano, quienes también han enrumbado en este frustrante pero satisfactorio sendero de la investigación.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1. <i>Clostridium perfringens</i>	3
1.1. TAXONOMÍA	3
1.2. HISTORIA	3
1.3. HABITAT	4
1.4. MORFOLOGÍA	4
1.5. FISIOLOGÍA	5
1.6. GENOMA	6
1.7. IDENTIFICACIÓN	8
1.8. TIPIFICACIÓN	9
1.9. TOXINAS PRINCIPALES	
10	
1.9.1. Toxina alfa	10
1.9.2. Toxina beta	11
1.9.3. Toxina epsilon	12
1.9.4. Toxina iota	13
1.9.5. Enterotoxina del <i>C. perfringens</i> : CPE	14
1.9.6. Toxina beta dos	16
1.10. DIAGNÓSTICO MOLECULAR: GENOTIPIFICACIÓN	17

<b>2. ENTEROTOXEMIA EN ALPACAS</b>	<b>18</b>
<b>2.1. ETIOLOGÍA</b>	<b>18</b>
<b>2.2. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>19</b>
<b>2.3. PATOGENIA</b>	<b>21</b>
<b>2.4. SIGNOS CLÍNICOS</b>	<b>21</b>
<b>2.5. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS</b>	<b>22</b>
<b>2.6. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS</b>	<b>24</b>
<b>2.7. DIAGNÓSTICO</b>	<b>25</b>
<b>2.8. TRATAMIENTO</b>	<b>25</b>
<b>2.10. CONTROL</b>	<b>26</b>
<b>2.11. PREVENCIÓN</b>	<b>26</b>
<b>3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</b>	<b>27</b>
<b>3.1. DEFINICIÓN</b>	<b>27</b>
<b>3.2. ETAPAS DE LA PCR</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1. Desnaturalización</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2. Hibridización</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3. Extensión</b>	<b>28</b>
<b>3.3. COMPONENTE DE LA PCR</b>	<b>29</b>
<b>3.3.1. ADN patrón</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2. Iniciadores</b>	<b>29</b>
<b>3.3.3. Concentración de MgCl<sub>2</sub></b>	<b>30</b>
<b>3.3.4. <i>Taq polimerasa</i></b>	<b>30</b>
<b>3.3.5. dNTP</b>	<b>30</b>
<b>3.4. VARIANTES DE LA PCR</b>	<b>30</b>
<b>3.4.1. PCR Múltiple</b>	<b>31</b>
<b>3.4.2. AFLP</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3. RAPD-PCR</b>	<b>31</b>
<b>3.5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR</b>	<b>32</b>
<b>3.5.1. Ventajas</b>	<b>32</b>
<b>3.5.2. Desventajas</b>	<b>32</b>

<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
1.	LOCALIZACIÓN	34
2.	ANIMALES	34
3.	METODOLOGÍA	35
3.1.	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	35
3.2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>C. perfringens</i>	35
3.3.	EXTRACCIÓN DE ADN BACTERIANO	36
3.4.	PCR MÚLTIPLE	37
3.5.	DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE <i>C. perfringens</i>	38
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
1.	DIAGNÓSTICO DE ENTEROTOXEMIA DE LOS ANIMALES MUESTREADOS	40
1.1.	ANIMALES AFECTADOS	40
1.2.	SIGNOS CLÍNICOS	42
1.3.	LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS	42
1.4.	LESIONES HISTOPATOLÓGICAS	46
2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>C. perfringens</i>	49
3.	EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>C. perfringens</i>	53
4.	PCR MÚLTIPLE	53
5.	VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR MÚLTIPLE	57
6.	GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>C. perfringens</i>	59
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>63</b>

<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	<b>73</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA</b>	<b>74</b>
<b>IX. APÉNDICES</b>	<b>86</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Clasificación de tipos de <i>C. perfringens</i> en base a la presencia de sus cuatro toxinas letales.	9
<b>Cuadro 2:</b> Iniciadores empleados en la PCR Múltiple para genotipificar y subtipificar aislamientos de <i>C. perfringens</i> .	37
<b>Cuadro 3:</b> Genotipos de <i>C. perfringens</i> clasificados en base a la presencia de los genes codificantes de las toxinas principales.	38
<b>Cuadro 4:</b> Subtipos de <i>C. perfringens</i> clasificados en base a la presencia de los genes <i>cpe</i> y <i>cpb2</i> .	39
<b>Cuadro 5:</b> Características tintoriales, hemolíticas y bioquímicas de los <i>C. perfringens</i> aislados de animales muertos por enterotoxemia.	50
<b>Cuadro 6:</b> Genotipos y subtipos de controles positivos y negativos	53
<b>Cuadro 7:</b> Genotipos y subtipos de <i>C. perfringens</i> aislados de crías muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.	56
<b>Cuadro 8:</b> Frecuencias y porcentajes de los genotipos y subtipos de <i>C. perfringens</i> aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.	60
<b>Cuadro 9:</b> Distribución de frecuencias y porcentajes según departamentos de los genotipos y subtipos de <i>C. perfringens</i> aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.	61
<b>Cuadro 10:</b> Distribución de frecuencias y porcentajes según centros de crianza de alpacas de los genotipos y subtipos de <i>C. perfringens</i> aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Alpacas neonatas muertas durante una epizootia de enterotoxemia ocurrida en la comunidad alpaquera de Ccaicco, año 2005.	41
<b>Figura 2:</b> Distribución porcentual de los grupos etareos de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia.	41
<b>Figura 3:</b> Alpaca neonata perteneciente a la comunidad alpaquera de Ccaicco mostrando signo nervioso de opistótono.	42
<b>Figura 4:</b> Distribución porcentual de la condición corporal de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia.	43
<b>Figura 5:</b> Lesiones macroscópicas de una alpaca neonata muerta por enterotoxemia en el fundo alpaquero privado.	44
<b>Figura 6:</b> Distribución porcentual de lesiones anatomopatológicas encontradas en intestino delgado de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia.	44
<b>Figura 7:</b> Distribución porcentual de lesiones anatomopatológicas encontradas en estomago, timo, bazo, hígado y riñón de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia.	45
<b>Figura 8:</b> Alteraciones histopatológicas en intestino delgado de 3 alpacas muertas por enterotoxemia.	46
<b>Figura 9:</b> Distribución porcentual de lesiones histopatológicas encontradas en intestino delgado de animales muertos por enterotoxemia.	47
<b>Figura 10:</b> Lesiones entéricas en alpacas muertas por enterotoxemia asociadas a <i>E. macusaniensis</i> .	48
<b>Figura 11:</b> Patrón hemolítico característico de <i>C. perfringens</i> en agar sangre.	49
<b>Figura 12:</b> Morfología bacilar y positividad a la tinción Gram del <i>C. perfringens</i>	51
<b>Figura 13:</b> Reacción de Nagler del <i>C. perfringens</i> sobre agar yema de huevo.	52
<b>Figura 14:</b> Positividad a la reducción de sulfito del <i>C. perfringens</i> en agar TSC.	52
<b>Figura 15:</b> Calidad y cantidad del ADN extraído de los <i>C. perfringens</i> aislados.	53
<b>Figura 16:</b> Productos PCR Múltiple de aislamientos de <i>C. perfringens</i> y cepas controles positivas en gel de agarosa al 2%.	54

<b>Figura 17:</b> Productos de PCR Múltiple de los aislamientos de <i>C. perfringens</i> y controles negativos en gel de agarosa al 2%.	54
<b>Figura 18:</b> Productos PCR Múltiple de aislamientos de <i>C. perfringens</i> en gel de agarosa al 2%.	55
<b>Figura 19:</b> Productos de PCR Simple para la detección del gen <i>cpa</i> y productos de PCR Simple para la detección del gen <i>cpb2</i> de <i>C. perfringens</i> en gel de agarosa al 2%.	58

## RESUMEN

La enterotoxemia, causada por el *Clostridium perfringens*, es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a las alpacas, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70%. A pesar de esto, existe poca información sobre los factores de virulencia (toxinas) del *C. perfringens* que participan en la etiopatogénesis de la enfermedad. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el genotipo de los *C. perfringens* aislados de casos de enterotoxemia en base a la presencia de los genes (*cpa*, *cpb*, *etx* e *iap*) codificantes de las toxinas principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ) así como el subtipo en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* codificantes de la enterotoxina (CPE) y la toxina  $\beta_2$ , respectivamente. En el estudio se analizaron 47 aislamientos de *C. perfringens* obtenidos de intestino de crías muertas de alpaca con signos clínicos y lesiones anatomopatológicas e histopatológicas correspondientes a enterotoxemia. El ADN de estos aislados fue extraído y analizado por la técnica de PCR Múltiple conteniendo iniciadores específicos para los genes codificantes de las toxinas mencionadas, encontrándose en 33/47 (70.2%) aislamientos sólo al gen *cpa* (genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ ), en 13/47 (27.7%) a los genes *cpa* y *cpb2* (genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^+$ ) y en 1/47 (2.1%) a los genes *cpa*, *cpb* y *cpe* ( genotipo A subtipo  $cpe^+cpb2^-$ ). Estos resultados evidencian principalmente a la toxina  $\alpha$ , así como a la  $\beta_2$  y  $\beta$  participar en la etiopatogénesis de la enterotoxemia en las alpacas.

**PALABRAS CLAVE:** *Clostridium perfringens*, genotipificación, enterotoxemia, alpacas.

## SUMMARY

Enterotoxemia, caused by the *Clostridium perfringens*, is the most important infectious disease which affects alpacas, causing up to 70% neonatal mortality. In spite of this, little information exists on the virulence factors (toxins) of *C. perfringens* which play an important role in the etiopathogenesis of the disease. The objective of the present study was to determine the genotype of *C. perfringens* isolated from cases of enterotoxemia based on the presence of genes (*cpa*, *cpb*, *etx* and *iap*) which encode the main toxins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  and  $\iota$ ), as well as the subtypes based on the presence of genes *cpe* and *cpb2* which encode the enterotoxin (CPE) and  $\beta$ 2-toxin respectively. A total of 47 isolations of *C. perfringens* were obtained from the small intestine of neonatal alpaca mortalities which had both clinical signs and gross and histological injuries typical of enterotoxemia. The DNA was extracted from these isolates and analyzed by PCR Multiplex using specific primers for the toxin genes. The *cpa* gene genotype A subtype *cpe*<sup>-</sup>*cpb2*<sup>-</sup> was the only gene found in 70.2% (33/47) of the isolations. In 27.7% (13/47) of the cases the *cpa* and *cpb2* (genotype A subtype *cpe*<sup>-</sup>*cpb2*<sup>+</sup>) genes were found and in 2.1% (1/47) the *cpa*, *cpb* and *cpe* (genotype C subtype *cpe*<sup>+</sup>*cpb2*<sup>-</sup>) genes were present. These results demonstrate the primary role of  $\alpha$ -toxin, as well as the presence of  $\beta$ 2 and  $\beta$ -toxins in the etiopathogenesis of enterotoxemia in alpacas.

**KEY WORDS:** *Clostridium perfringens*, genotypification, enterotoxemia, alpacas.

## I. INTRODUCCIÓN

La enterotoxemia es la enfermedad infecciosa más importante que afecta a las alpacas, debido a que ocasiona elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70% en centros de crianza alpaquera del Perú (Ramírez *et al.*, 1985); provocando la merma de su población e interferencia con los programas de mejoramiento genético. El agente causante de la enfermedad es el *Clostridium perfringens*, siendo el tipo A el principalmente involucrado (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ramírez, 1987); aunque también han sido reportados los tipos B (Prehn *et al.*, 1999), C (Moro, 1971) y D (Fowler, 1998).

El *C. perfringens* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, móvil, formador de esporas y causante de una gran variedad de enfermedades en humanos y animales (Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990). El *C. perfringens* se encuentra ampliamente distribuido en los suelos y en la flora microbiana intestinal de animales y humanos (Hatheway, 1990; Songer, 1996). La virulencia de esta especie está determinada por la presencia de sus potentes exotoxinas, las cuales son usadas para la tipificación. Así, el tipo A posee sólo la toxina  $\alpha$ ; el tipo B a las toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ; el tipo C a las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ ; el tipo D a las toxinas  $\alpha$  y  $\epsilon$ ; y el tipo E a las toxinas  $\alpha$  y  $\iota$  (Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999).

Además, existen otros factores de virulencia del *C. perfringens* que han sido encontrados y asociados a problemas entéricos. Dentro de ellos, la enterotoxina (CPE), la cual es producida principalmente por el tipo A. (Hatheway, 1990; Rood, 1998; Petit

*et al.*, 1999). La CPE es una endotoxina sintetizada sólo durante la fase de esporulación (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004), la cual provoca pérdida de fluidos y electrolitos en la mucosa intestinal (McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004). La CPE ha mostrado tener un rol central en casos de intoxicación de origen alimentario en humanos (Sparks *et al.*, 2001).

Otra toxina es la toxina  $\beta_2$ , una de las últimas toxinas identificadas y su gen *cpb2* caracterizado. La secuencia de aminoácidos de esta toxina no tiene significativa homología pero sí similar actividad biológica a la toxina  $\beta$  (Gibert *et al.*, 1997; Smedley *et al.*, 2004). Asimismo, ha sido demostrada la asociación del gen *cpb2* con casos de enteritis necrótica en cerdos (Waters *et al.*, 2003) y tiflocolitis en caballos (Herholz *et al.*, 1999).

Actualmente, técnicas moleculares como la PCR Múltiple han demostrado ser confiables herramientas de diagnóstico y determinación de los principales factores de virulencia del *C. perfringens*, siendo empleado por muchos investigadores en trabajos realizados en cerdos (Waters *et al.*, 2003), corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001), pollos (Engström *et al.*, 2003), venados (Embury-Hyatt *et al.*, 2005), caballos (Herholz *et al.*, 1999) y humanos (Sparks *et al.*, 2001).

El presente estudio, usando la técnica de PCR Múltiple, determinó el genotipo en base a la presencia de los genes (*cpa*, *cpb*, *etx* e *iap*) codificantes de las toxinas principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ) y el subtipo en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* codificantes de la CPE y la toxina  $\beta_2$  de 47 aislamientos de *C. perfringens* obtenidos de alpacas neonatas muertas que cursaron con signos clínicos y presentaron lesiones anatomopatológicas e histopatológicas compatible a cuadros de enterotoxemia.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. *Clostridium perfringens*

#### 1.1. TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica del *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) según Manual de Bergey de Bacteriología Sistémica (Garrity *et al.*, 2001) es:

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Phylum:	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Clostridia</i>
Orden:	<i>Clostridiales</i>
Familia:	<i>Clostridiaceae</i>
Género:	<i>Clostridium</i>
Especie:	<i>Clostridium perfringens</i>

#### 1.2. HISTORIA

*C. perfringens* fue aislado y descrito adecuadamente, por primera vez, en 1892 por Welch y Nutball a partir de muestras obtenidas de un cadáver humano en descomposición, siendo llamado *Bacillus aerogenes capsulatus*, termino que no fue aceptado por las reglas de nomenclatura y por lo tanto, invalidado. Luego, en 1898, Veillon y Zuber lo denominan *Bacillus perfringens*. Pero, en 1900, Migula se refiere

a este organismo como *Bacillus welchii*, denominación preferida por los investigadores americanos (Merchant y Packer, 1961; Gillespie y Timoney, 1981). Sin embargo, la denominación de Veillon y Zuber (1898) tuvo más trascendencia, siendo reemplazado, en 1939, el nombre *Clostridium welchii* por *Clostridium perfringens* en la quinta edición del Manual de Bergey de Bacteriología Sistémica (Dushesnes y Mainil, 2005).

### **1.3. HABITAT**

Algunos tipos de *C. perfringens* (tipo A) se encuentran ampliamente distribuidos como flora normal del suelo y tracto intestinal de animales de sangre caliente; mientras que otros (tipo B, C, D y E) son menos comunes en el tracto intestinal y pueden ocasionalmente ser encontrados en el ambiente, en áreas donde enfermedades producidas por estos microorganismos son enzooticas (Joclik y Willett, 1991; Songer, 1996).

### **1.4. MORFOLOGÍA**

Microscópicamente, *C. perfringens* se presenta como un bacilo Gram positivo grueso, recto, solitario o en pares, rara vez en cadena (Gillespie y Timoney, 1981). Las dimensiones de este microorganismo son de 0.8–1.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 4–8  $\mu\text{m}$  de largo (Merchant y Packer, 1961; Cruickshan, 1965; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986). La longitud varía de acuerdo al estado de proliferación, así como la composición iónica y nutricional del medio. Así, los cultivos jóvenes que proliferan con rapidez pueden tener forma casi cocoide o cúbica, mientras en cultivos viejos se observan células más elongadas (Joclik y Willett, 1991).

A diferencia de los otros clostridios patógenos, *C. perfringens* es inmóvil y la presencia de una cápsula puede ser evidenciada en frotis directo de fluidos corporales y tejidos, pero no siempre son demostrables en cultivos (Cruickshan, 1965; Cowan, 1974; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Joclik y Willett, 1991; Brooks *et al.*, 1998). El *C. perfringens* forma esporas, que pueden ser centrales o subterminales, de forma ovalada, y lo suficientemente pequeñas para no

causar ensanchamiento del bacilo (Merchant y Packer, 1961; Duchesnes y Mainil, 2005). Además, algunas cepas de *C. perfringens* varían en su habilidad para esporular, necesitando generalmente de medios especiales para hacerlo (Barach *et al.*, 1974).

Macroscópicamente, *C. perfringens* desarrolla colonias de superficie larga, redonda, lisa, irregular y ligeramente opaca. Otros tipos de colonias observadas, incluyen algunas con centro opaco, levantado y de borde plano transparente, que es radialmente estriado (Cruickshan, 1965).

## 1.5. FISIOLÓGÍA

*C. perfringens* es un microorganismo anaerobio tolerante, y puede sobrevivir e incluso proliferar con tensiones de oxígeno que son inhibitorios para otros clostridios, que son anaerobios estrictos (Joclik y Willett, 1991). Los clostridios no producen catalasa y sólo sintetizan niveles bajos de superóxido dismutasa. Se cree que una de las causas que sean anaerobios es porque no tienen otra manera de liberarse de  $H_2O_2$  y  $O^{2-}$  que son tóxicos para ellos (Madigan *et al.*, 2001).

*C. perfringens* carece del sistema de citocromo y de un mecanismo para la fosforilación por transporte de electrones (ciclo del ácido tricarbóxico); por tanto, obtienen ATP sólo mediante la fosforilación a nivel del sustrato (constituido básicamente por azúcares) (Madigan *et al.*, 2001). En las rutas de fermentación, piruvato es convertido en acetyl-CoA por la piruvato ferredoxin oxidoreductasa, produciendo  $CO_2$  y ferredoxina reducida. Los electrones de la ferredoxina reducida son transferidos a protones por hidrogenasas, resultando en la formación de moléculas de hidrógeno que son liberados de la célula junto con  $CO_2$ . Esta típica producción de gases podría contribuir a la ventaja en el crecimiento y supervivencia en tejidos del hospedador, generando un ambiente anaeróbico preferido. El piruvato, también, es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa, mientras la acetyl CoA es convertida a etanol, acetato, y butirato a través de varias reacciones enzimáticas (Madigan *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002).

*C. perfringens* fermenta una variedad de azúcares tales como glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa (Cowan, 1974; Carter, 1979; Hatheway, 1990), levulosa, galactosa, manosa, xylosa, trehalosa, raffinosa, almidón, glucogeno e inositol produciendo gas y ácido (principalmente ácido acético y butírico). Algunas cepas también hidrolizan glicerol e inulina (Gillespie y Timoney, 1981).

*C. perfringens* puede proliferar en: un rango de pH de 5.5 a 8.0, una actividad acuosa para crecimiento mínimo de 0.95, y un espectro de temperatura de 20 a 50°C, con un óptimo de 45°C, teniendo un tiempo de germinación tan corto como ocho minutos (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991; Universidad de Kentucky, 2006).

## 1.6. GENOMA

Los genomas clostridiales generalmente consisten de un cromosoma circular de doble hebra, con un tamaño entre 3.5 a 7.0 Mb, y frecuentemente acompañadas de bacteriófagos integrados y episomales, transposones y plásmidos de tamaños entre 3 a 200 kb (Dushesnes y Mainil, 2005).

Shimizu *et al.* (2002) secuenciaron y analizaron el ADN del genoma completo de una cepa de *C. perfringens* tipo A (cepa 13), el cual poseyó un cromosoma de 3.03 Mbp con un contenido G+C (28.6%) pronunciadamente bajo y un plásmido (pCP13) de 54.3 kb con un contenido G+C (25.5%) ligeramente más bajo al cromosomal. El cromosoma presentó 2660 ORF que representan el 83.1% de la secuencia cromosomal completa, y el plásmido pCP13 poseyó 63 posibles ORF.

El genoma contuvo secuencias para las enzimas típicas de fermentación anaeróbica y para varias enzimas sacarolíticas, pero ninguna para el ciclo de ácido tricarbóxico o cadena respiratoria. Asimismo, muchos genes codificantes de enzimas para la biosíntesis de aminoácidos estuvieron ausentes. Sin embargo, fueron detectados varios genes codificantes de proteínas importadoras ABC, potencialmente envueltos en el transporte de aminoácidos, así como nuevos posibles factores de virulencia para *C. perfringens* entre ellos: cinco genes que codifican hemolisinas, además de las toxinas  $\alpha$  y  $\theta$ ; cuatro genes cuyos productos son

similares a la enterotoxina de *Bacillus cereus*; dos genes que codifican posibles proteínas de unión a fibronectina con similitudes a los de *Listeria monocitogenes* y *Bacillus subtilis*. Además, en el plásmido PCP13 se encontró el gen *cpb2* (codificante de la toxina  $\beta_2$ ) y otro gen (*CpCna*) asociado a virulencia, cuyo posible producto mostró similitud a una adhesina de colágeno de *Staphylococcus aureus*. El *CpCna* podría estar envuelto en el adosamiento de *C. perfringens* al colágeno del hospedero y funcionar como un factor de colonización (Shimizu *et al.*, 2002).

La localización de los genes codificantes de toxinas es muy variable. Los genes *cpa* (toxina  $\alpha$ ), *pfoA* (toxina  $\theta$ ), *colA* (toxina  $\kappa$ ) y *nagH* (toxina  $\mu$ ) se localizan en regiones variables del cromosoma cerca al origen de replicación. Sólo los genes *nanH* (neuraminidasa H) y *nanI* (neuraminidasa I) están localizados en regiones conservadas del cromosoma. En contraste, los genes *cpb* (toxina  $\beta$ ), *cpb2* (toxina  $\beta_2$ ), *etx* (toxina  $\epsilon$ ), *iap* y *ibp* (toxina  $\iota$ ), *lam* (toxina  $\lambda$ ) y *ureA-C* (ureasa) están localizados en plásmidos de varios tamaños (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Brüggemann, 2005). Por otro lado, el gen *cpe* puede ser encontrado o en una región variable del cromosoma o en un plásmido de gran tamaño (Petit *et al.*, 1999; Brynstad *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 2002; Miyamoto *et al.*, 2004). Así, los cinco tipos de *C. perfringens* tienen una organización genómica muy similar y la habilidad para producir diferentes toxinas resulta de la pérdida o adquisición de genes de toxinas específicos (Brüggemann, 2005; Sawires y Songer, 2006). Interesantemente, estos genes de virulencia no se encuentran agrupados, ni forman islas de patogenicidad (Shimizu *et al.*, 2002; Brüggemann, 2005).

*C. perfringens* parece contar con cerca de 10 operones rRNA que contribuyen a su rápido crecimiento. Un operón rRNA, operón *rrnA*, es asociado a genes de ADN girasas, *gyrA* y *gyrB*, siendo estos arreglos en *B. subtilis* y *S. aureus* asociados con los orígenes cromosomales de replicación, *oriC*. Intercalando con los RNA operones están muchos genes tRNA, cuyas familias de genes están confinadas a un área. Este arreglo compacto es altamente benéfico para una bacteria esporulante, asegurando un inmediato suministro de componentes para el aparato transcripcional seguida a la germinación de la espora (Rood y Cole, 1991; Duchesnes y Mainil, 2005).

La regulación de síntesis de toxinas extracelulares esta dada básicamente por el sistema de transducción de señales de dos componentes denominado VirR/VirS, que regula la expresión de los genes cromosomales codificantes de las toxinas  $\alpha$ ,  $\theta$  y  $\kappa$  (Rood, 1998; Shimizu *et al.*, 2002; Brüggemann, 2005), y de los genes extracromosomales codificantes de la toxina  $\beta$ 2 y la proteína de adhesión a colágeno (Brüggemann, 2005). Por otra parte, la regulación de la producción de CPE podría ser o dependiente de factores sigma esporulación-específica (SigE y SigK) (Rood, 1998; Zhao y Melville, 1998) o por el activador transcripcional CcpA necesario para la esporulación eficiente (Brüggemann, 2005).

## 1.7. IDENTIFICACIÓN

*C. perfringens* crece bajo condiciones de anaerobiosis, teniendo un óptimo desarrollo a 45°C (Hatheway, 1990). La morfología de la bacteria y su colonia fueron descritos anteriormente (1.4. Morfología).

El crecimiento en caldo carne es rápido, con producción de ácido y gas, teniendo el cultivo un olor hediondo y mostrando la carne sin digestión y enrojecida (Cruickshan, 1965). Las colonias de *C. perfringens* crecidas sobre medio agar sangre usualmente muestran una característica zona de doble hemólisis alrededor de la colonia: una zona interna clara (hemólisis completa o tipo  $\beta$ ) debido a la toxina  $\theta$ ; y una zona externa nublosa (hemólisis incompleta o tipo  $\alpha$ ) debido a la toxina  $\alpha$ . En medio agar yema de huevo, las colonias son rodeadas por una ancha zona opaca circular, reconocida como la reacción de lecitinasa (Reacción de Nagler) debido a la toxina  $\alpha$ . En los medios enriquecidos con leche, casi todas las cepas de *C. perfringens* producen una “Fermentación Tormentosa”, debido a la fermentación de la lactosa, producción de gas, y coagulación, pero no a la digestión de caseína (Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991).

Las características bioquímicas complementarias son: motilidad negativa, licuefacción de gelatina, reducción de nitrato, producción de H<sub>2</sub>S, reducción de sulfito, indol negativo, lipasa negativo, ureasa negativo, catalasa y oxidasa negativo, y fermentación de una gran cantidad de azúcares (Merchant y Packer, 1961;

Cruickshan, 1965; Cowan, 1974; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Jocklik y Willett, 1991).

### 1.8. TIPIFICACIÓN

Las cepas de *C. perfringens* son clasificadas en cinco tipos (A, B, C, D y E) en base a la producción de cuatro toxinas letales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ). Las cepas tipo A producen toxina  $\alpha$ ; tipo B producen toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ ; tipo C producen toxinas  $\alpha$  y  $\beta$ ; tipo D producen toxinas  $\alpha$  y  $\epsilon$ ; y tipo E producen toxinas  $\alpha$  y  $\iota$  (Cuadro 1) (Cruickshan, 1965; Gillespie y Timoney, 1981; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Jocklik y Willett, 1991; Songer, 1996; Petit *et al.* 1999; Quinn *et al.*, 2005). Un sexto tipo, tipo F, fue descrito para una cepa aislada en un brote humano de enteritis necrótica en Alemania en 1949. La cepa producía toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  y habría sido clasificada como tipo C, pero fue inusualmente resistente al calor y carecía de tres antígenos menores ( $\delta$ ,  $\theta$  y  $\kappa$ ) encontrados en la clásica cepa tipo C. Estas diferencias fueron consideradas injustificadas para establecer un nuevo tipo (Bruner y Gillespie, 1966; Hatheway, 1990). Todas estas toxinas son secretadas durante la fase de crecimiento exponencial (Petit *et al.*, 1999).

**Cuadro 1:** Clasificación de tipos de *C. perfringens* en base a la presencia de sus cuatro toxinas letales.

TIPO TOXINA	A	B	C	D	E
$\alpha$	+	+	+	+	+
$\beta$	-	+	+	-	-
$\epsilon$	-	+	-	+	-
$\iota$	-	-	-	-	+

(+) producción de toxina; (-) Ausencia de producción de toxina.

El método de tipificación clásica se basa en pruebas de neutralización toxina-antitoxina *in vivo*, empleando sobrenadantes de cultivos líquidos de *C. perfringens*, tratadas y no tratadas con tripsina. La tripsina es necesaria para activar, si estuviesen presentes, las toxinas  $\epsilon$  y  $\iota$ ; sin embargo inactiva a la toxina  $\beta$ , por lo que ambas

muestras tratadas y no tratadas deben de ser evaluadas. Luego estas muestras serán enfrentadas con y sin antisuero de cada tipo, para después ser inoculadas vía intradermal en cobayos o intraperitoneal en ratones para evidenciar la seroneutralización toxina-antitoxina (Cruickshan, 1965; Nicolet, 1986; Hatheway, 1990; Songer, 1996). La respuesta en cobayos (dermonecrosis) es notada después de 24 a 48 horas y en ratones (letalidad) a las 72 horas (Songer, 1996).

Las antitoxinas a los tipos comúnmente encontrados neutralizaran las toxinas letales de estos tipos como siguen: i) cepas tipo A producen toxinas tipo A, y la antitoxina homologa neutralizara sólo a la toxina tipo A; ii) cepas tipo B producen toxinas tipo B, y la antitoxina homologa neutralizara a las toxinas tipo A, B C y D; iii) cepas tipo C producen toxinas tipo C, y la antitoxina homologa neutralizara a las toxinas tipo A, B y C; iv) cepas tipo D producen toxinas tipo D, y la antitoxina homologa neutralizara a las toxinas tipo A y D (Merchant y Packer, 1961; Cruickshan, 1965; Gillespie y Timoney, 1981); y v) cepas tipo E producen toxinas tipo E, y la antitoxina homologa neutralizara a las toxinas tipo A y E (Gillespie y Timoney, 1981).

## **1.9. TOXINAS PRINCIPALES**

### **1.9.1. Toxina alfa ( $\alpha$ )**

La toxina  $\alpha$  o fosfolipasa C del *C. perfringens* fue la primera toxina bacteriana que mostró tener actividad enzimática. El gen codificante de la toxina  $\alpha$  (gen *cpa*) está presente en todos los tipos (A-E) de *C. perfringens*, y está situado cromosomalmente cerca al posible origen de replicación, entre dos operones rRNA (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998).

La toxina  $\alpha$  es una zinc-metalofosfolipasa que hidroliza exclusivamente fosfatidilcolina y esfingomiélin, responsable de su actividad citotóxica, necrótica y hemorrágica (Songer, 1997; Rood, 1998; Titball *et al.*, 1999). Posee un peso molecular de 43 kDa y un pH isoelectrico de 5.4 (Titball *et al.*, 1999), y

para su actividad requiere la presencia de iones de  $Zn^{++}$  y  $Ca^{++}$  (Hatheway, 1990; Titball *et al.*, 1999).

La toxina  $\alpha$  está conformada por dos dominios: un dominio amino-terminal (dominio N) compuesto de hélices  $\alpha$  y otro dominio carboxi-terminal (dominio C) compuesto de hojas  $\beta$ -plegadas. Estos dominios están unidos por una región común flexible (Rood, 1998; Titball *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). El dominio N contiene el sitio activo de la fosfolipasa C esencial para todas las actividades; mientras, el dominio C sugiere tener un rol clave en la interacción con la membrana fosfolipídica (Titball *et al.*, 1999).

La capa externa de la membrana celular eucariota es rica en fosfatidilcolina y esfingomiélin, substratos preferidos de la toxina  $\alpha$ , que al ser hidrolizadas generan diacylglicerol y ceramida, respectivamente (Titball *et al.*, 1999). El diacylglicerol es un importante segundo mensajero, activando proteinkinasa C (PKC), el cual activa fosfolipasas eucariotas, especialmente fosfolipasas  $A_2$ , C y D. Los productos de fosfolipasa  $A_2$  proveen de sustrato a la cascada de ácido araquidónico, resultando en la producción de tromboxanos, leucotrienos y prostaglandinas. La PKC también estimula la producción en células endoteliales del factor activador plaquetario (PAF) y prostaciclina. Todo esto, resulta en constricción de vasos sanguíneos, incremento de la permeabilidad vascular, agregación plaquetaria y disfunción miocárdica, todos los cuales contribuyen a manifestaciones locales y sistémicas caracterizadas por un profundo shock y muerte (Songer, 1997; Titball *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 1999; Gijon *et al.*, 2000; Stevens y Bryant, 2002).

### **1.9.2. Toxina beta ( $\beta$ )**

La toxina  $\beta$  es una exotoxina, presente en cepas *C. perfringens* del tipo A y C, que induce inflamación, necrosis de mucosa intestinal y es letal en ratones (Songer, 1996). La toxina  $\beta$  purificada posee un peso molecular entre 28 y 40 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004; Duchesnes y Mainil, 2005) y un pH isoeléctrico de 5.6 (Hatheway, 1990). El gen de la toxina

$\beta$  (gen *cpb*) se encuentra localizado en un plásmido (Smedley *et al.*, 2004; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), el cual revela un ORF codificante de un polipéptido de 336 aminoácidos que incluye una secuencia señal de 27 aminoácidos que es cortada para producir una toxina activa (Smedley *et al.*, 2004; Rood, 1998). La toxina  $\beta$ , secretada durante la última fase de crecimiento logarítmico (Smedley *et al.*, 2004), es termolábil y sensible a proteasas (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de la toxina  $\beta$  es poco conocido. Sin embargo, la toxina  $\beta$  muestra una significativa homología, a nivel de aminoácidos, con la toxinas  $\alpha$ , toxina  $\gamma$  y leucocidin de *Staphylococcus aureus*, las cuales oligomerizan y forman poros en membranas celulares eucariotas, sugiriendo que la toxina  $\beta$  podría tener una actividad similar, resultando en alteración de la permeabilidad de la membrana, y consecuente muerte celular (Rood y Cole, 1991; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Duchesnes y Mainil, 2005).

### 1.9.3. Toxina epsilon ( $\epsilon$ )

La toxina  $\epsilon$  es una exotoxina producida por cepas de *C. perfringens* del tipo B y D, que posee actividad letal, necrotizante y edematizante (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004). El gen de la toxina  $\epsilon$  (gen *etx*), encontrado en un plásmido de gran tamaño (Songer, 1996; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004), codifica una protoxina relativamente inactiva constituida de 311 aminoácidos y un peso molecular de 35.25 kDa (Hatheway, 1990). La protoxina es activada por acción de proteasas intestinales, tales como tripsina y quimiotripsina, y así como también, por proteasas propias (toxina  $\lambda$ ) del *C. perfringens* (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley *et al.*, 2004), mediante remoción proteolítica en los residuos 13 aminoterminal y 22 carboxiterminal (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) formando una toxina activa de 283 aminoácidos (Rood, 1998). La toxina  $\epsilon$  activada interactúa con receptores apropiados (probablemente proteínas glicosiladas) en la membrana celular (Smedley *et al.*, 2004). La toxina  $\epsilon$  no es internalizada; sino se une fuertemente a la membrana celular (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) formando un largo complejo (155 kDa) por interacción

con una sola clase de proteínas de membrana (Petit *et al.*, 1999). Este largo complejo es un heptámero que actúa como un poro no selectivo, alterando la permeabilidad de la membrana celular (Smedley *et al.*, 2004).

#### **1.9.4. Toxina iota ( $\iota$ )**

La toxina  $\iota$  es una exotoxina producida por cepas de *C. perfringens* del tipo E. Posee actividad dermonecrotica, causa alteración de la permeabilidad y es letal en ratones (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood y Cole, 1991). La toxina  $\iota$  esta compuesta por dos componentes que son inmunológicamente y biológicamente distintos: un componente enzimático (Ia) y un componente de unión (Ib). La presencia de ambos es necesaria para la actividad citotóxica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Duchesnes y Mainil, 2005). La toxina  $\iota$  es codificada por dos genes ubicados en un plásmido (Petit *et al.*, 1999), los cuales están localizados agrupados y organizados en un operón (Duchesnes y Mainil, 2005). El componente Ia, codificado por el gen *iap* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), con un peso molecular de 47.5 kDa (Hatheway, 1990; Rood, 1998) y un pH isoelectrico de 5.2 (Hatheway, 1990) posee actividad ADP-ribosiltransferasa-actina específica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ib, codificado por el gen *ibp* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999), con un peso molecular de 100 kDa (Dushesnes y Mainil, 2005) y un pH isoelectrico de 4.2 (Hatheway, 1990), reconoce un receptor de superficie celular para la internalización de ambos componentes por endocitosis mediada por receptor y translocación del componente Ia dentro del citoplasma (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005). Los componente Ia y Ib (toxina  $\iota$ ) son sintetizados durante la fase de crecimiento exponencial y secretados como proteínas no activas, protoxinas (Dushesnes y Mainil, 2005). Ambos componentes son proteolíticamente activados por: remoción de un péptido N-terminal de 20 kDa en el componente Ib (80 kDa) y remoción de 9 a 11 residuos N-terminales en el componente Ia (Dushesnes y Mainil, 2005). El componente Ia actúa intracelularmente catalizando ADP-ribosa, la cual unida al sitio de actina previene la nucleación y polimerización de monómeros de actina ADP-

ribosilada. El resultado es la depolimerización de filamentos de actina y acumulación de actina en forma de polímeros (Petit *et al.*, 1999; Dushesnes y Mainil, 2005).

#### **1.9.5. Enterotoxina del *C. perfringens* : CPE**

La enterotoxina del *C. perfringens* (*C. perfringens* enterotoxin; CPE) es una endotoxina sintetizada sólo durante la fase de esporulación, la cual induce una significativa secreción de agua e iones en enterocitos, provocando descamación y acortamiento de las microvellosidades intestinales (Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004). La CPE no posee actividad necrotizante (Niilo, 1986). La CPE es producida por menos del 5% de la población de *C. perfringens* (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004), principalmente por cepas tipo A (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004) aunque también por cepas tipo C y D (Hatheway, 1990; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999) y sólo pocas cepas tipo D y E han mostrado producirla (Hatheway, 1990; Petit *et al.*, 1999). El gen que codifica la CPE (gen *cpe*) puede ser encontrado en una región variable del cromosoma (cepas aisladas de casos de intoxicación de origen alimentario) o en un largo plásmido (cepas aisladas de casos de gastroenteritis humana no asociadas a intoxicación de origen alimentario y de casos entéricos en animales) (Songer, 1996; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002; Smedley *et al.*, 2004). El gen *cpe*, localizado cromosomalmente, es un transposon de 6.3 kb que comprende dos copias flanqueantes de secuencias de inserción IS1470 y una copia de IS1469 (Brynstad *et al.*, 1997; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002); mientras el gen *cpe* localizado extracromosomalmente es encontrado en un gran plásmido de 100 a 120 kb, donde es flanqueado por la secuencia de inserción IS1469 y, en algunos cepas, por otra secuencia de inserción, IS1151 (Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Miyamoto *et al.*, 2002). Además, el gen *cpe* plasmídico ha demostrado ser transferido por mecanismos conjugativos (Brynstad *et al.*, 2001; Smedley *et al.*, 2004).

La CPE consiste de un péptido de 309 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa (Hatheway, 1990; Rood y Cole, 1991; Rood, 1998; Smedley *et al.*, 2004), un pH isoelectrico de 4.3 (Hatheway, 1990) y una solubilidad de 3.44 mg/ml (Rood y Cole, 1991). La CPE consta de un dominio N-terminal con actividad citotóxica y un dominio C-terminal con actividad de receptor (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Takahashi *et al.*, 2005). La tripsina y quimiotripsina provocan remoción proteolítica de 10-44 aminoácidos N-terminales, incrementando, en dos a tres veces, la actividad citotóxica (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Rood, 1998).

La biosíntesis de CPE ocurre después de la activación del gen *cpe* por factores transcripcionales (SigE y SigK), los cuales también controlan los genes de esporulación (Rood y Cole, 1991; Zhao y Melville, 1998), acumulándose la CPE en grandes cantidades y formando cuerpos de inclusión en el compartimiento de la célula madre de la espora de *C. perfringens*, y siendo liberado al lumen intestinal sólo cuando la célula madre lisa y libera su espora (Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004).

La CPE se une a un receptor proteínaceo (posiblemente un claudin-4) presente en la membrana citoplasmática del borde en ribete del enterocito. Los claudines son una gran familia de proteínas que juegan importantes roles en estructura y función de “tight junction” (McClane, 2000; Smedley *et al.*, 2004). Después de la unión de la CPE con su receptor forman el “complejo pequeño” de un peso molecular de 90 kDa, que se inserta en la membrana celular (Rood y Cole, 1991; Smedley *et al.*, 2004). Este complejo *per se* no es suficiente para inducir citotoxicidad. Por lo que, inmediatamente el “complejo pequeño” se une a otra proteína de membrana (70 kDa) para formar el “gran complejo”, complejo hidrofóbico de un peso molecular de 160 kDa. El “gran complejo”, aparentemente, tiene propiedades tipo poro, permitiendo el libre pasaje de pequeñas moléculas a través de la membrana, y conduciendo a la alteración de su permeabilidad. Finalmente, causa un colapso coloidosmótico y la muerte celular (Rood y Cole, 1991; Songer, 1996; Petit *et al.*, 1999; McClane, 2002; Smedley *et al.*, 2004).

### 1.9.6. Toxina beta dos ( $\beta 2$ )

Una nueva toxina del *C. perfringens*, la toxina  $\beta 2$ , ha sido descrita (Gibert *et al.*, 1997) y su gen (gen *cpb2*) asociado a la presentación de enfermedades entéricas en animales (Herholz *et al.*, 1999; Garmory *et al.*, 2000; Gkiourtzidis *et al.*, 2001; Bueschel *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2003; Engstrom *et al.*, 2003; Dray, 2004; Smedley *et al.*, 2004; Embury-Hyatt *et al.*, 2005; Jost *et al.*, 2005; Boujon *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* es localizado en un plásmido de 59 a 100 kb (Gibert *et al.*, 1997; Rood, 1998; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004) y su expresión es positivamente regulada por el sistema regulatorio transcripcional VirR/VirS (Schotte *et al.*, 2004), alcanzando su máximo nivel durante la fase logarítmica tardía (Smedley *et al.*, 2004). Este gen ha sido encontrado en todos los tipos de *C. perfringens* (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2005); aunque, su expresión no ha sido demostrada en todas las cepas *cpb2* positivas (Schotte *et al.*, 2004; Jost *et al.*, 2005).

El gen *cpb2* codifica un péptido de 31 kDa, el cual es procesado transcripcional a una toxina biológicamente activa, toxina  $\beta 2$ , con un peso molecular de 28 kDa y un pH isoelectrónico de 5.01 (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004). La toxina  $\beta 2$  es altamente susceptible a acción proteolítica. Así, tratamientos con tripsina escinden a la toxina  $\beta 2$  en dos péptidos (13 y 15 kDa), resultando en una completa pérdida de citotoxicidad (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004).

A pesar de su nombre, la toxina  $\beta 2$  no tiene significativa homología con la toxina  $\beta$  (15% de similitud de aminoácidos) (Gibert *et al.*, 1997; Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004) y sólo existe un bajo nivel de reacción inmunológica cruzada entre estas (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004). Posee actividad letal para ratones (dosis de 3  $\mu$ g) (Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004), actividad citotóxica para algunas líneas celulares (Gibert *et al.*, 1997; Smedley *et al.*, 2004) y también provoca necrosis hemorrágica en

mucosa intestinal en pruebas de intestino ligado (Petit *et al.*, 1999; Schotte *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2004).

La actividad específica de la toxina  $\beta 2$  aún no está totalmente clara, pero posiblemente sea la formación de un poro u otro mecanismo que conduzca a una disrupción de la membrana celular (Petit *et al.*, 1999; Smedley *et al.*, 2004; Schotte *et al.*, 2004).

### **1.10. DIAGNÓSTICO MOLECULAR: GENOTIPIFICACIÓN**

La correcta identificación de los tipos de *C. perfringens* es crítica para estudios epidemiológicos y para el desarrollo de efectivas medidas de prevención, incluyendo vacunación (Petit *et al.*, 1999; Archambault *et al.*, 2002; Baums *et al.*, 2004). Técnicas moleculares (PCR e hibridización de ADN) han sido desarrolladas para tipificar al *C. perfringens*, las cuales son mucho más confiables y rápidas en relación a las clásicas pruebas de neutralización *in vivo* en ratones y cobayos (Petit *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004).

En particular, el diagnóstico molecular en investigación general, es muy usado para detección del gen *cpe*, el cual es raramente expresado bajo condiciones normales de cultivo (Petit *et al.*, 1999; Wen *et al.*, 2003; Miyamoto *et al.*, 2004).

Muchos protocolos de PCR Múltiple han sido elaborados para genotipificar, en base a detección de los genes *cpa*, *cpb*, *etx* y *iap*, y subtipificar, en base a detección de los genes *cpe* y *cpb2*, cepas de *C. perfringens* aisladas de pollos (Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), cerdos (Kanakaraj *et al.*, 1998; Waters *et al.*, 2003), caballos (Herholz *et al.*, 1999), corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001) y otras especies (Songer y Meer, 1996; Yoo *et al.*, 1997; Garmory *et al.*, 2000; Baums *et al.*, 2004; Stagnitta *et al.*, 2002; Bueschel *et al.*, 2003).

También, otras técnicas moleculares han sido empleadas para genotipificar cepas de *C. perfringens* como: ADN microarray (Al-Khaldi *et al.*, 2004; Al-Khaldi *et al.*, 2005), ribotipificación (Schalch *et al.*, 2003), electroforesis de gel en campo

pulsado (Pulsed Field Gel Electroforesis; PFGE) (Nauerby *et al.*, 2003) y análisis de repeticiones en tandem en número variable de múltiples locus (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Análisis; MLVA) (Sawires y Songer, 2005).

Sin embargo, el genotipo resultante es sólo indicativo del potencial de virulencia, puesto que la presencia de un gen no siempre guarda correlación con su expresión (Petit *et al.*, 1999).

## **2. ENTEROTOXEMIA DE LAS ALPACAS**

### **2.1. ETIOLOGÍA**

La enterotoxemia de las alpacas también conocida como diarrea bacilar o enfermedad de Moro es causada por las toxinas del *C. perfringens* (Moro, 1971; Moro, 1987), siendo involucrado mayormente el tipo A (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez, 1987; Moro, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1989b) y, sólo en algunos casos, el tipo C (Moro, 1971; Moro, 1987) en la sierra sur del Perú. Mientras, en Chile y en E.U.A. han sido reportados los tipos A y B, (Prehn *et al.*, 1999) y los tipos A (Fowler, 1998), C (Fowler, 1998; Whitehead, 2005) y, posiblemente, el D (Fowler, 1998), respectivamente, en casos de enterotoxemia en alpacas.

Inicialmente, la toxina  $\alpha$  fue considerada como el principal factor de virulencia involucrado en cuadros enterotóxicos por *C. perfringens* tipo A (Moro, 1971; Moro, 1987). Sin embargo, estudios realizados por Ramírez (1987) demostraron la producción de la CPE, durante la fase de esporulación por algunas cepas de *C. perfringens* tipo A, con deficiente capacidad de producción *in vitro* de toxina  $\alpha$ , aisladas de casos típicos de enterotoxemia en crías de alpacas. Asimismo, ensayos de intestino ligado en llamas jóvenes inoculadas con cepas enterotóxicas esporuladas, provocaron acumulación de fluidos y presencia de gas en los segmentos intestinales en experimentación, así como también la aparición de algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimación y congestión de mucosas).

Además, la CPE pudo ser evidenciada serológicamente en el contenido intestinal, mostrando a la CPE como principal factor de virulencia involucrado en el desarrollo de la enfermedad (Ramírez, 1987; Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988).

## 2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La enterotoxemia de las alpacas se presenta en forma epizoótica durante la época de parición, y se encuentra relacionada a factores climáticos, especialmente abundante lluvia. Además, deficiencias en el manejo e higiene (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ramírez, 1989b; Ameghino y De Martini, 1991; Solis, 1997; Bustinza, 2000).

La presentación de la enfermedad provoca elevadas y variables tasas de mortalidad neonatal en alpacas y llamas tanto en pequeñas comunidades alpaqueras, así como en centros experimentales y grandes empresas alpaqueras, reportándose tasas anuales de mortalidad neonatal debido a enterotoxemia de: 0.6 a 48.9% en la estación experimental “La Raya” en Puno durante los años 1973-1979 (Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez, 1989b), 24.16%, como promedio, en doce fundos alpaqueros en Puno durante los años 1972-1973 (Carvajal, 1974), 5.11 a 25.81% en doce fundos alpaqueros de Puno en 1974 (Bustinza, 2000), 37.2% en llamas en el centro de investigaciones “La Raya” en Puno durante los años 1997-2000 (Condemayta y Quispe, 2002), y un estimado de 70% en medianos criadores alpaqueros en Cusco en 1980 (Ramírez *et al.*, 1985).

El comportamiento de las presentaciones epizoóticas de la enfermedad describe una secuencia cíclica, con rangos entre elevadas y bajas tasas de mortalidad neonatal, varias veces. El ciclo es usualmente de cinco años (+/- 1 año) en hatos individuales. Esta ciclicidad posiblemente se deba a la variación en la transferencia de anticuerpos específicos de la madre hacia la cría durante la presentación de las epizootias (Ramírez *et al.*, 1985; Ellis, 2006).

### **Factores relacionados al huésped**

La enterotoxemia afecta principalmente a crías de alpacas y llamas entre los 3 a 80 días de edad, siendo las de 2 a 3 semanas de edad las más susceptibles (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998; Bustinza, 2000). Paradójicamente, se ha observado que son las crías de buena condición corporal las más susceptibles a desarrollar la enfermedad (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000). La enfermedad afecta tanto a crías hembras como a machos; sin embargo, han mostrado verse más afectadas las crías de raza Suri y las de pelaje de color blanco que las de raza Huacaya y las de pelaje de otros colores, respectivamente (Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000).

Además, se sabe que las alpacas nacen con una cantidad ligeramente baja de proteínas totales en su suero (6.4 mg/ml), y esta disminuye aún más en las dos primeras semanas de edad (5.7-5.8 mg/ml), para luego aumentar progresivamente conforme avanza su edad. Contrariamente, la gammaglobulina que al nacimiento es de 1.4 mg/ml desciende dramáticamente a 0.98, 0.76 y 0.79 mg/ml a los 8, 15 y 22 días, respectivamente, y es precisamente a esta edad que las crías muestran mayor susceptibilidad a enfermarse por enterotoxemia (Ramírez *et al.*, 1985).

### **Factores relacionados al medio ambiente:**

La época de parición siempre es programada para los meses de Enero a Marzo, periodo que coincide con los meses de intensa precipitación fluvial, la cual favorece al crecimiento y desarrollo de los pastos. Además, una desproporcionada composición del número de crías y madres en relación al área de pastoreo dará lugar a un incremento de materia orgánica de desecho (Ramírez *et al.*, 1985).

Esta asociación, abundante lluvias, hacinamiento y animales susceptibles estaría favoreciendo la presentación de epizootias de enterotoxemia, debido a que la extrema humedad del suelo contribuye a la presencia, multiplicación y modificación biológica de esporas y células vegetativas de *C. perfringens*. Así como, la extrema variación entre temperatura máxima (14°C) y mínima (3°C), que deben soportar las crías a pocos días de nacidas (Ramírez *et al.*, 1985).

### 2.3. PATOGENIA

La principal vía de ingreso del *C. perfringens* es la oral. Es probable que las crías ingieran una masiva cantidad de esporas y/o células vegetativas del clostridio (Ramírez *et al.*, 1985; Ramírez *et al.*, 1998). Posteriormente, en el lumen intestinal un ligero pH alcalino y el incremento de carbohidratos en la dieta (cambio de dieta, inicio de consumo de forraje) (Ramírez y Ellis, 1988) o una excesiva ingestión de leche que ocasione indigestión (Ameghino y De Martini, 1991), favorecerían el desarrollo de un ambiente óptimo para la multiplicación y esporulación del *C. perfringens* tipo A, sintetizándose la toxina  $\alpha$  y la CPE (Ramírez y Ellis, 1988; Ameghino y De Martini, 1991). Una vez sintetizadas las toxinas, posiblemente la CPE, en el lumen intestinal provoca alteración en la permeabilidad de la pared intestinal resultando en acumulación de fluidos y electrolitos dentro del lumen, así como la absorción de toxinas al torrente sanguíneo (Ramírez *et al.*, 1998). El animal, probablemente, muera por acidosis metabólica de carácter fatal por pérdida de la reserva alcalina de la sangre y tejidos hacia el lumen intestinal. Asimismo, puede haber muerte por shock debido a que las toxinas afectan las neuronas (Ameghino y De Martini, 1991).

Además, ha sido establecida una relativa asociación entre el pH fecal, el inicio del consumo de pasturas nativas y la excreción de CPE y de *E. coli*, siendo mayor los aislamientos de *E. coli*, cuando el pH fecal fue ligeramente ácido a neutro; mientras, los niveles de CPE fueron notorios cuando el pH fecal fue ligeramente alcalino, asociado al consumo de pastura. Sin embargo, la CPE fue detectada en niveles muy bajos en muestras de heces de alpacas neonatas clínicamente sanas (Rivera y Ramírez, 1999).

### 2.4. SIGNOS CLÍNICOS

La muerte súbita puede, muchas veces, ser el único signo encontrado. Los signos clínicos y su intensidad van a depender de la cantidad de toxinas presentes en el organismo. Las crías afectadas muestran depresión, anorexia, permanecen postradas y alejadas de su madre con las orejas dirigidas hacia atrás, los ojos cerrados y los

miembros estirados. Luego, el cuadro progresa y las crías aparecen con los miembros anteriores estirados, la cabeza apoyada sobre el suelo, el abdomen distendido y emiten quejidos posiblemente debido al dolor abdominal. Algunas ingieren abundante cantidad de agua (polidipsia) y otras desarrollan apetito depravado (polifagia) que se manifiesta por la ingestión de arena, piedrecillas, etc. del suelo. La temperatura tiende a ser normal, pero a veces sobrepasa los 40°C, y suelen echarse centralmente en los arroyos y charcos de agua. La temperatura disminuye notablemente (hipotermia) en el estado agónico. El cuadro toxémico, en su etapa final, causa alteraciones nerviosas tales como convulsiones y opistótonos. Finalmente, el animal entra en coma y muere (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998; Bustinza, 2000).

La diarrea esta ausente en la mayoría de las crías que desarrollan la enfermedad, siendo la constipación algo más frecuentemente encontrado (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Sin embargo, algunas crías pueden presentar descargas diarreicas posiblemente asociadas a infecciones mixtas con *Escherichia coli* u otros microorganismos enteropatógenos (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). Estas crías raramente mueren, posiblemente debido a que eliminan las toxinas en las descargas diarreicas (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

## **2.5. LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS**

Externamente, la carcasa se observa, usualmente, en buena condición muscular con el abdomen distendido por la presencia de gas en los intestinos. El tejido subcutáneo puede estar congestionado y presentar hemorragias petequiales (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). En cavidad torácica, el lumen de la traquea y los bronquios con contenido espumoso que algunas veces se encuentra acompañado de ingesta. Los pulmones aparecen congestionados y edematosos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). Los nódulos linfáticos torácicos de tamaño incrementado y hemorrágicos (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). El timo se presenta congestionado y con hemorragias petequiales en su superficie

(Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). Tanto en cavidad torácica como en saco pericárdico existe, frecuentemente, presencia de abundante exudado seroso claro y ligeramente viscoso (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). En el corazón, las arterias coronarias se encuentran dilatadas y las aurículas presentan petequias en su superficie (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998).

Al explorar la cavidad abdominal, es perceptible un olor desagradable y característico a la enfermedad (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Los intestinos están distendidos con fluido acuoso, cuyo color varía de acuerdo al tipo de ingesta, pudiendo ser blanquecino, amarillento, verdoso y plomizo (Moro, 1971; Moro, 1987; Ramírez *et al.*, 1998). El intestino delgado, particularmente yeyuno e ileon, se encuentra congestionado (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998) y hemorrágico (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994). En intestino grueso se presentan hemorragias focales con zonas de impacción conteniendo heces duras (Oha, 1994). Las placas de Peyer se encuentran inflamadas, siendo más notorios en el intestino grueso (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998). Los ganglios linfáticos mesentéricos, aparecen incrementados de tamaño, congestionados y/o hemorrágicos (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998). En el estómago glandular, la mucosa puede estar congestionada o hemorrágica (Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998).

El bazo a veces aumentado de tamaño (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). El hígado aparentemente normal, pero algunas veces congestionado (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Ramírez *et al.*, 1998). En los riñones es posible observar congestión en la corteza renal (Ameghino y De Martini, 1991; Oha, 1994; Fowler, 1998) y a veces, hemorragias petequiales en su superficie (Oha, 1994). La vejiga generalmente se encuentra distendida debido a la acumulación de orina como consecuencia de su parálisis. El encéfalo se presenta severamente congestionado y es notorio el acumulo de liquido cefalorraquídeo entre las meninges (Ramírez *et al.*, 1998; Fowler, 1998).

Palacios (2004), en un reciente estudio de caracterización anatómo-histopatológica de lesiones entéricas en crías muertas de alpaca con cuadros clínicos compatibles a enterotoxemia, describe minuciosa y detalladamente las siguientes lesiones anatomopatológicas en duodeno: enteritis catarral (100%); en yeyuno: enteritis hemorrágica (46.7%), panenteritis hemorrágica (26.7%), enteritis necrótica (16.6%); en ileon: enteritis necrótica (56.6%), enteritis hemorrágica (20%), enteritis fibrinosa (13.3%); en ciego: tiflitis catarral (40%), tiflitis necrótica (26.7%), tiflitis fibrinosa (13.3%); en colon: colitis catarral (63.3%), colitis necrótica (30%), colitis hemorrágica (10%), colitis fibrinosa (16.7%).

## **2.6. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS**

Palacios (2004), en el mismo estudio, también, describe minuciosa y detalladamente las siguientes lesiones histopatológicas. En duodeno: enteritis necrótica (90%), enteritis catarral (10%); en yeyuno: enteritis necrótica (60%), panenteritis necrótica hemorrágica (20%), enteritis necrótica hemorrágica (13.3%), panenteritis necrótica supurativa (6.7%); en ileon: enteritis necrótica (70%), enteritis fibrinonecrótica (13.3%), panenteritis necrótica hemorrágica (6.7%), enteritis necrótica supurativa (6.7%), panenteritis necrótica supurativa (3.3%); en ciego: tiflitis necrótica (46.7%), tiflitis muconecrótica (20%), tiflitis fibrinonecrótica (13.3%), tiflitis catarral (10%), tiflitis mucocatarral (6.7%), tiflitis necrótica hemorrágica (3.3%); en colon: colitis necrótica (46.6%), colitis muconecrótica (20%), colitis catarral (16.7%), colitis necrótico hemorrágico (6.7%).

Además, Oha (1994) describe lesiones histopatológicas en diferentes órganos de crías muertas de alpacas con enterotoxemia, encontrando en pericardio: congestión pericárdica aguda (86.67%) y pericarditis aguda (13.33%); en corazón: congestión miocárdica (53.33%), miocarditis hemorrágica (40%), miocarditis aguda (6.67%); en timo: timitis hemorrágica (46.47%), congestión tímica (33.33%), timitis fibrinosa (20%); en ileon: ileítis regional hemorrágica (100%); en colon: colitis catarral aguda (53.33%) y colitis hemorrágica (47.67%); en hígado: congestión hepática aguda (40%) y colangitis supurativa (13.33%); en ganglio linfático mesentérico: hipoplasia nodular mesentérica (40%) y linfadenitis mesentérica hemorrágica (60%); en

riñones: nefritis tubular degenerativa (56.67%), nefritis hemorrágica (36.67%), pielonefritis supurativa (3.33%), degeneración grasa (3.33%); en vejiga urinaria: congestión vesical (53.33%), cistitis catarral aguda (46.67%).

## **2.7. DIAGNÓSTICO**

Actualmente, para el diagnóstico de la enterotoxemia de las alpacas se deben tomar en cuenta los siguientes criterios: i) identificar la magnitud del problema en el campo mediante la identificación de las características epidemiológicas de la mortalidad de las crías enfermas y muertas, signos clínicos y lesiones anatomopatológicas; ii) efectuar el reconocimiento de esporas y/o bacilos esporulados en fróntices directos de contenido de intestino delgado (ileon y yeyuno) teñidos con coloración específica para esporas; iii) detectar serológica y/o biológicamente a la CPE en fluidos corporales (exudado peritoneal o pericárdico) de las crías muertas para llegar a un diagnóstico definitivo. Con este propósito han sido desarrolladas varias pruebas inmunológicas que varían desde una alta especificidad, como la del ELISA, hasta una baja especificidad, como la prueba de inmunodifusión doble (Ramírez, 1988; Ramírez y Ellis, 1988; Ramírez, 1989a; Ramírez, 1990; Ramírez *et al.*, 1998).

Métodos convencionales, como el cultivo bacteriológico en anaerobiosis, puede ser incluido en el diagnóstico de la enfermedad. Generalmente es posible aislar abundante cantidad de *C. perfringens* de contenido intestinal, linfonodos mesentéricos, músculos, corazón e hígados (Ramírez *et al.*, 1998). Sin embargo, la mejor muestra a enviarse al laboratorio de diagnóstico es un fragmento de intestino delgado (ileon) de unos 20 cm de longitud ligado a sus extremos. Este fragmento de intestino se pone en un frasco de boca ancha que contiene bórax en polvo, o sino en glicerol tamponado (Moro, 1971; Moro, 1987).

## **2.8. TRATAMIENTO**

No existe un tratamiento satisfactorio contra la enterotoxemia de las alpacas, debido a que no existe ningún producto farmacológico de uso práctico que actúe

contra las toxinas en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, los animales que presentan diarrea debido a infecciones mixtas pueden tratarse para reducir la carga bacteriana, y así evitar que se sigan difundiendo en los campos (Ameghino y De Martini, 1991; Ramírez *et al.*, 1998). Asimismo, crías que no presenten diarrea se les podría administrar algún laxante, como sulfato de magnesio, para favorecer la expulsión de las bacterias y sus toxinas (Ameghino y De Martini, 1991)

## **2.9. CONTROL**

Establecida la epizootia en el rebaño es necesario cambiar de lugar los dormideros, y si es posible, cambiar también canchas o parideros, a lugares más alejados (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991). Aunque, todos estos procedimientos han mostrado no traer significativa reducción de la mortalidad una vez establecida la epizootia (Melo *et al.*, 1999). También, se acostumbra la administración de antibióticos de uso oral a todas las crías del rebaño afectado durante 3 días consecutivos (Moro, 1971; Moro, 1987; Ameghino y De Martini, 1991).

## **2.10. PREVENCIÓN**

La prevención esta dada básicamente por medidas inmunoprolifáticas a través del uso de vacunas tipo anacultivos de *C. perfringens*, asociados a adecuadas medidas de manejo (higiene de corrales) para hacerlas más efectivas (Moro, 1971; Moro, 1987).

Así, Yaya y Rosadio (2005) en un estudio de tres años sobre prevención contra la enterotoxemia de las alpacas, usando vacunas (anacultivos) conteniendo *C. perfringens* tipo A, B, C y D, los que fueron aplicados tanto a madres como a crías, mostraron una significativa reducción de la mortalidad neonatal debido a enterotoxemia de 19.5 a 1%, demostrando su utilidad en el campo.

También, se ha demostrado que un toxoide elaborado a partir de CPE indujo producción de anticuerpos anti-CPE en la madre, apareciendo tanto en calostro

como en el suero del recién nacido (Ramírez, 1990); pero su efectividad no ha podido ser demostrada aún en campo (Ellis, 2006).

Estudios de prevención en base a antibióticos (Ampicilina+sulfato de colistina), administrados vía parenteral hasta la onceava semana de edad demostraron no tener efecto significativo en la prevención de la enfermedad (Pezo *et al.*, 1999).

### **3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

#### **3.1. DEFINICIÓN**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático de síntesis *in vitro* de largas cantidades de una región diana de ADN (Brown, 2000). Este proceso de amplificación requiere de cantidades mínimas de ADN. La técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis, y descrita por primera vez en 1985, siendo esta una manera más simple de sintetizar grandes cantidades de ADN *in vitro*, basándose en el procedimiento que emplea la célula *in vivo* (Erlich y Arnheim, 1992).

#### **3.2. ETAPAS DE LA PCR**

Las etapas de la PCR se llevan a cabo, una tras otra, en episodios cíclicos. Cada ciclo consiste de tres etapas:

##### **3.2.1. Desnaturalización**

Durante la desnaturalización (a temperatura de 95°C), las dobles cadenas del ADN se separan para formar cadenas sencillas. En la etapa inicial de desnaturalización, es esencial que se desnaturalice completamente el patrón de ADN. La desnaturalización incompleta del ADN dará como resultado el uso ineficiente del patrón en el primer ciclo de amplificación y en consecuencia, en un escaso rendimiento del producto de la PCR. (Sambrook *et al.*, 1989; Brown, 2000)

### 3.2.2. Hibridización

Durante la hibridización (a temperaturas que oscilan entre 45°C y 60°C), un iniciador se une a una cadena de ADN y otro se une a la cadena complementaria. Los sitios de hibridación de los iniciadores se han elegido para que fomenten la síntesis del ADN en la región de interés durante la extensión. La temperatura de hibridación se calcula en 5°C por debajo de la temperatura de fusión del duplo iniciador-patrón de ADN. Si se obtienen productos de la PCR no específicos, además del producto esperado, la temperatura de hibridación se puede optimizar aumentándola por incrementos de 1 a 2°C (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

### 3.2.3. Extensión

Durante la extensión (a temperatura cerca de 72°C) la síntesis del ADN se lleva a cabo en la región de interés y con distancias variables en la región flanqueante, produciendo fragmentos de longitudes variables. Esta síntesis es realizada por una ADN polimerasa termoestable, la *Taq polimerasa*, junto con un suministro de precursores de ADN (dexasinucleosidos trifosfatos: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la mezcla es calentada a una temperatura óptima para la síntesis de ADN, entre 70 a 75°C. Los oligonucleótidos alineados en el ADN molde, actúan ahora como iniciadores para la síntesis de nuevos polinucleótidos complementarios para las cadenas molde de ADN (Sambrook *et al*, 1989; Erlich y Arnheim, 1992; Brown, 2000). Una extensión de 1 minuto es suficiente para sintetizar fragmentos de PCR de hasta 2 kb (kb = kilobase = 1000 pb). Cuando se amplifican fragmentos de ADN más grandes, el tiempo generalmente se extiende a razón de 1 min por cada 1000 pb (Sambrook *et al*, 1989).

Después del último ciclo, las muestras suelen incubarse a 72°C durante 5 min para completar los extremos que sobresalen de los productos de la PCR recién sintetizados (Sambrook *et al*, 1989).

Los ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión son repetidos de 20 a 30 veces, con un número de moléculas de ADN sintetizado que se dobla durante

cada ciclo, esta exponencial amplificación resulta en la síntesis de un gran número de copias de la secuencia de ADN flanqueado por el par de iniciadores (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

### **3.3. COMPONENTES DE LA PCR**

#### **3.3.1. ADN patrón**

Casi todos los métodos estándar de extracción de ADN son apropiados. La cantidad adecuada está entre 0.1 y 1 µg de ADN genómico, para una mezcla total de reacción de 100 µl. Cantidades más grandes de ADN patrón elevan, generalmente, el rendimiento de productos de la PCR no específicos (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

#### **3.3.2. Iniciadores**

Los iniciadores de la PCR deben tener entre 10 y 24 nucleótidos de longitud. El contenido de GC debe estar entre 40 y 60%. El iniciador no debe ser auto-complementario o complementario de otro cebador en la mezcla de reacción, para evitar así la formación de dímeros de cebadores u horquillas. Las temperaturas de fusión de los pares de iniciadores no deben diferir en más de 5°C, de modo que tanto el contenido de GC como la longitud se deben elegir adecuadamente (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

Las temperaturas de fusión y de hibridación de un iniciador se calculan así: si la longitud del iniciador es menor que 25 nucleótidos, el valor de la temperatura de fusión se calcula con la fórmula:  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ . La temperatura de hibridación debe ser, aproximadamente, 5°C inferior que la temperatura de fusión (Erlich y Arnheim, 1992; Brown, 2000;)

### **3.3.3. Concentración de MgCl<sub>2</sub>**

Puesto que los iones Mg<sup>2+</sup> forman complejos con los dNTP, con los iniciadores y los patrones de ADN, hay que establecer la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub> para cada experimento. Si los iones Mg<sup>++</sup> son demasiado escasos, se obtiene un bajo rendimiento del producto de la PCR y si son abundantes, aumentará el rendimiento de productos no específicos. El intervalo recomendado de concentración de MgCl<sub>2</sub> es de 1 a 3 mM, en las condiciones de reacción estándar especificadas (Sambrook *et al*, 1989).

### **3.3.4. Taq polimerasa**

La *Taq polimerasa* es una ADN polimerasa tipo I obtenida de la enzima de una bacteria termotolerante, *Thermus aquaticus*. Si las concentraciones de *Taq polimerasa* son mayores que las requeridas pueden sintetizarse productos no específicos (Sambrook *et al*, 1989; Brown, 2000).

### **3.3.5. dNTP**

La concentración de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en la mezcla de reacción es generalmente de 200 µM. Se debe comprobar que estas concentraciones sean iguales, porque una inexactitud aumentará el grado de incorporación errónea (Sambrook *et al*, 1989).

## **3.4. VARIANTES DE LA PCR**

En la actualidad existen muchas variantes de la PCR como AFLP, Asymetric-PCR, Colony-PCR, Degenerate-PCR, Hot-start, Inverse-PCR, *In situ* PCR, Long-PCR, Múltiple PCR, PCR-ELISA, PCR-RFLP, PCR-SSCP, QL-PCR, RACE-PCR, RAPD-PCR, Real Time PCR, Rep-PCR, RT-PCR.

### **3.4.1. PCR Múltiple**

Describe una PCR en la cual están presentes múltiples pares de iniciadores (hasta 8), lo que da una serie de productos, los cuales pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa (Tettelin *et al*, 1999).

### **3.4.2. AFLP**

Se basa también en la PCR, pero con una variante. El ADN que se estudia es previamente digerido por la acción de dos enzimas de restricción. Esto produce miles de cortos fragmentos de ADN. Posteriormente, los extremos de estos fragmentos son ligados a unas secuencias de nucleótidos denominadas “Adaptadores”. A continuación, se realiza una PCR en la que se utilizan iniciadores que hibridan con los adaptadores y uno o dos nucleótidos extras, que imponen una selección y reducen el número de fragmentos que se van a amplificar a unos cientos. El resultado de la amplificación se somete a electroforesis y detección radioactiva, visualizándose cientos de bandas polimórficas (Olive y Bean, 1999).

### **3.4.3. RAPD-PCR**

Esta técnica consiste en una PCR con una variante. Los iniciadores que se utilizan son más cortos de lo normal (10 nucleótidos) y son de secuencia arbitraria. Además, la fase de hibridación de los iniciadores se verifica a una temperatura de 34 a 36 °C, en lugar de los 55-60 °C habituales. El efecto de estas variaciones es que debido a estas condiciones de hibridación, tan poco restrictivas, los iniciadores se hibridan en puntos al azar en todo el genoma. Como resultado se producen un gran número de bandas muy polimórficas y que permiten distinguir variedades (Olive y Bean, 1999).

### **3.5. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR**

#### **3.5.1. Ventajas**

- Rapidez: Se puede obtener resultados de muchas muestras en el mismo día (Innis, 1995).
- Sensibilidad. PCR es una herramienta de diagnóstico extremadamente sensible, para detectar fracciones de ADN de todo tipo de organismos (Innis, 1995)
- Especificidad. Debido a que el ADN constituye el material genético único de cada organismo (Innis, 1995).
- Versatilidad. El mismo procedimiento experimental es dirigido con el mismo equipo, materiales, reactivos químicos y biológicos para amplificar cualquier ADN de interés (Innis, 1995).
- Información Genética. Uno de los aspectos más útiles de PCR es que puede proveer información sobre el organismo en estudio. Debido a la especificidad de los iniciadores, por ejemplo, puede determinarse el género, árbol filogenético, o nivel de especie (Innis, 1995).
- Accesibilidad de la muestra. Además de las muestras clínicas, pueden analizarse especímenes de una variedad de fuentes usando las mismas técnicas moleculares (Innis, 1995).
- No requiere esterilidad microbiológica. Desde que PCR requiere sólo pequeñas cantidades de ADN y no organismos, obvia la necesidad de la esterilidad microbiológica (Innis, 1995).
- Detección de organismos viables y no viables. Debido a que los organismos vivos no son necesarios para la detección exitosa (Innis, 1995).

#### **3.5.2. Desventajas**

- Riesgo de contaminación cruzada. A pesar de la extremada sensibilidad de PCR, la cual es una de las ventajas principales, existe el riesgo de resultados falso positivos. En teoría, una sola molécula podría contaminar las muestras en una amplificación subsecuente (Innis, 1995; Sambrook *et al*, 1989).

- Puede reproducir solamente parte del genoma en donde se conoce por lo menos una mínima secuencia de 20-40 pb (Innis, 1995; Sambrook *et al*, 1989).
- Necesitan “iniciadores” específicos que sean complementarios al fragmento que se desea sintetizar (Innis, 1995).
- Inestabilidad de los reactivos y altos costos. El problema clave para obtener y guardar los reactivos de PCR son su labilidad. Este problema empeora en climas tropicales, donde las temperaturas ambientales son elevadas (Innis, 1995).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LOCALIZACIÓN**

La toma de muestras tuvo lugar en cuatro centros de crianza de alpacas: la comunidad alpaquera de Ccaicco y la estación experimental de IVITA-Maranganí ubicados en la provincia de Canchis del departamento de Cusco, y la comunidad alpaquera de Picotani y un fundo alpaquero privado en la provincia de Melgar del departamento de Puno, todos estos a más de 3500 msnm, durante los meses de Enero y Febrero del año 2005. El procesamiento y análisis de éstas se realizaron en los ambientes de la Unidad de Bacteriología y la Unidad de Virología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **2. ANIMALES**

Se emplearon 47 alpacas (*Vicugna pacos*), los cuales cursaron con signos clínicos y presentaron lesiones anatomopatológicas e histopatológicas compatibles con un cuadro de enterotoxemia. Estos animales pertenecieron a distintos centros de crianza de alpacas, en donde la enfermedad se presentó a manera de epizootias. De los 47 animales, 9 pertenecieron a la comunidad alpaquera de Ccaicco, 6 a la estación experimental IVITA-Maranganí, 10 a la comunidad alpaquera de Picotani y 22 a un fundo alpaquero privado.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

El tiempo transcurrido entre la muerte del animal y la recolección de las muestras fue como máximo 8 horas. Las muestras para el aislamiento de *C. perfringens* consistieron de segmentos de intestino delgado afectado de aproximadamente 10 cm. de longitud ligado en sus extremos, los cuales fueron conservados en tetraborato de sodio (Bórax) (Moro; 1971) y transportados hacia el laboratorio para su procesamiento.

Para la descripción de las lesiones histopatológicas, muestras de intestino delgado de animales que cursaron con signos clínicos y presentaron lesiones anatomopatológicas compatibles a cuadros de enterotoxemia fueron fijados en formol salino bufferado, para posteriormente ser embebidos en parafina, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina.

#### **3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *C. perfringens***

Para el aislamiento bacteriano, pequeños segmentos (4 cm<sup>2</sup>) de muestra con su contenido se cultivaron en medio caldo tioglicolato (Merck) e incubaron en condiciones de anaerobiosis (Sistema Gaspack, Anaerocult A<sup>®</sup> Merck) a 45°C durante 48 horas. Luego, alícuotas (50 µl) del medio incubado se sembraron en agar sangre (medio agar tripticosa soya (Merck) suplementada con 5% de sangre de ovino desfibrinada estéril) e incubaron en condiciones de anaerobiosis a 45°C durante 48 horas.

Para la identificación del *C. perfringens* se utilizaron los siguientes criterios: i) crecimiento bajo condiciones de anaerobiosis; ii) morfología de la colonia; iii) formación característica de doble hemólisis (hemólisis completa e incompleta) en medio agar sangre; iv) morfología microscópica de la bacteria y su afinidad por la coloración Gram; v) capacidad de reducción de sulfito, evidenciada por formación de colonias negruscas en medio agar triptosa sulfato cicloserina (TSC) (Merck)

incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18 a 24 horas; vi) actividad lecitinasa, evidenciada por formación de zonas opacas alrededor de las colonias crecidas (Reacción de Nagler) en medio agar yema de huevo (medio agar tripticasa soya (Merck) suplementada con 10% de yema de huevo estéril) incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18 a 24 horas; y vii) reacción negativa a la prueba de catalasa.

Posteriormente, sólo una colonia bacteriana de cada muestra positiva a *C. perfringens* fue considerada como aislamiento, siendo cultivado en caldo carne e incubado en condiciones de anaerobiosis a 45°C durante 24 a 48 horas, para luego ser almacenados y conservados a -20°C.

### **3.3. EXTRACCIÓN DEL ADN BACTERIANO**

Los aislamientos de *C. perfringens*, una vez descongelados, se cultivaron en tubos conteniendo 5 ml de medio caldo tioglicolato e incubados en condiciones de anaerobiosis a 45°C durante 18 a 24 horas. Los cultivos obtenidos fueron centrifugados a 13 000 rpm durante 10 minutos para precipitar la biomasa celular, la cual fue transferida a un tubo microcentrífuga de 2 ml y resuspendida en 800 µl de EDTA 50 mM. Posteriormente, se adicionó 200 µl de lisozima (10 mg/ml), se mezcló suavemente e incubó a 37°C durante 60 a 120 minutos para después centrifugarse a 13000 rpm por 3 minutos. El precipitado resultante fue procesado mediante el kit comercial *DNA Purification Kit* (Wizard<sup>®</sup> Genomic) para la extracción del ADN, siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN extraído se colocó en tubos microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad y almacenó a -20°C.

Se determinó la cantidad (concentración) y la calidad (pureza) del ADN por comparación con diluciones seriadas de un marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA *Hind* III<sup>®</sup> (AMRESCO) a una concentración de 50 ng/µl en un gel de agarosa al 0.8%.

### 3.4. PCR MÚLTIPLE

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa múltiple ó PCR Múltiple se realizó bajo las condiciones descritas, con ligeras modificaciones, y usando los iniciadores diseñados (Cuadro 2) por Baums *et al.* (2004), para la detección de los genes *cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* y *cpb2*.

La mezcla de PCR Múltiple consistió de 15 µM de CPA5L, 15 µM de CPA5R, 9 µM de CPBL, 9 µM de CPBR, 5.3 µM de CPEL, 5.3 µM de CPER, 7.5 µM de CPETXL, 7.5 µM de CPETXR, 7.5 µM de CPIL, 7.5 µM de CPIR, 9 µM de CPB2L, 9 µM de CPB2R, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris·Cl (pH 8.3), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dGTP, 250 µM de dATP, 250 µM de dTTP, 250 µM de dCTP, 3.8 U de *Taq Polimerasa*, y 50-100 ng de ADN genómico bacteriano.

**Cuadro 2:** Iniciadores empleados en la PCR Múltiple para genotipificar y subtipificar aislamientos de *C. perfringens* (Baums *et al.*, 2004)

Gen	Iniciadores	Secuencia 5' → 3'	Longitud del producto amplificado (pb)
<i>cpa</i>	CPA5L CPA5R	AGTCTACGCTTGGGATGGAA TTTCCTGGGTTGTCCATTC	900
<i>cpb</i>	CPBL CPBR	TCCTTCTTGAGGGAGGATAAAA TGAACCTCCTATTTTGTATCCCA	611
<i>cpe</i>	CPEL CPER	GGGGAACCTCAGTAGTTTCA ACCAGCTGGATTTGAGTTTAATG	506
<i>etx</i>	CPETXL CPETXR	TGGGAACCTTCGATACAAGCA TTAACTCATCTCCCATAACTGCAC	396
<i>iap</i>	CPIL CPIR	AAACGCATTAAAGCTCACACC CTGCATAACCTGGAATGGCT	293
<i>cpb2</i>	CPB2L CPB2R	CAAGCAATTGGGGGAGTTTA GCAGAATCAGGATTTTGACCA	200

Además, se utilizaron como controles negativos: ADNs de *Clostridium septicum* y *Clostridium chauvoei*, y como controles positivos: ADNs de *C. perfringens* tipo A

(cepa de referencia de la Colección Español de Cultivos Tipos (CECT) 563) y *C. perfringens* tipo C (cepa de referencia CECT 820)

La amplificación de PCR Múltiple se realizó en un termociclador modelo 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems), consistiendo de una etapa inicial de desnaturalización (95°C, 4 min), seguido de 35 ciclos de desnaturalización (95°C, 1 min), hibridización (55°C, 1 min) y extensión (72°C, 1.5 min), y una etapa final de extensión (72°C, 7 min).

Los productos PCR fueron separados mediante electroforesis (cámara de electroforesis tipo horizontal) en gel de agarosa (SeaKem®) al 2% con buffer TBE 0.5X a 100 V durante dos horas. Para evidenciar las bandas de ADN amplificadas (amplicones), el gel fue teñido en bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las distintas bandas fue determinado mediante marcadores de peso molecular de 100 pb (*DNA ladder*, Gene Ruler<sup>TR</sup>, Fermentas) y de 1 kb (*DNA ladder*, Gene Ruler<sup>TR</sup>, Fermentas).

### 3.5. DETERMINACIÓN DE GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE *C. perfringens*

Para la determinación de genotipos de los aislamientos de *C. perfringens* se tomó en consideración la clasificación realizada por Petit *et al.* (1999), que está basada en la presencia de los genes (*cpa*, *cpb*, *etx* y *iap*) codificantes de las toxinas principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ) (Cuadro 3).

**Cuadro 3:** Genotipos de *C. perfringens* clasificados en base a la presencia de los genes codificantes de las toxinas principales (Petit *et al.*, 1999).

Genotipo Gen	A	B	C	D	E
<i>cpa</i>	+	+	+	+	+
<i>cpb</i>	-	+	+	-	-
<i>etx</i>	-	+	-	+	-
<i>iap</i>	-	-	-	-	+

(+) Presencia del gen; (-) Ausencia del gen.

Para determinar el subtipo de los aislamientos de *C. perfringens* se tomó en consideración la clasificación realizada por Garmory *et al.* (2000), que está basada en la presencia y/o ausencia de los genes *cpe* y *cpb2* codificantes de la CPE y la toxina  $\beta_2$ , respectivamente (Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Subtipos de *C. perfringens* clasificados en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* (Garmory *et al.*, 2000)

Subtipo Gen	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
<i>cpe</i>	-	+	-	+
<i>cpb2</i>	-	-	+	+

(+) Presencia del gen; (-) Ausencia del gen.

### 3.6. ANALISIS ESTADISTICO

El presente estudio no necesitó de un análisis estadístico porque no buscó determinar alguna asociación entre las variables. Los resultados (genotipos y subtipos de *C. perfringens*) fueron presentados en frecuencias y porcentajes.

## **IV. RESULTADOS**

### **1. DIAGNÓSTICO DE ENTEROTOXEMIA EN LOS ANIMALES MUESTREADOS.**

Todos los cuarenta y siete animales muestreados fueron diagnosticados padecer de enterotoxemia de acuerdo a las características epidemiológicas, signos clínicos, lesiones anatomopatológicas e histopatológicas. Estos datos se encuentran detallados en el apéndice 1 y 2, y son descritos a continuación.

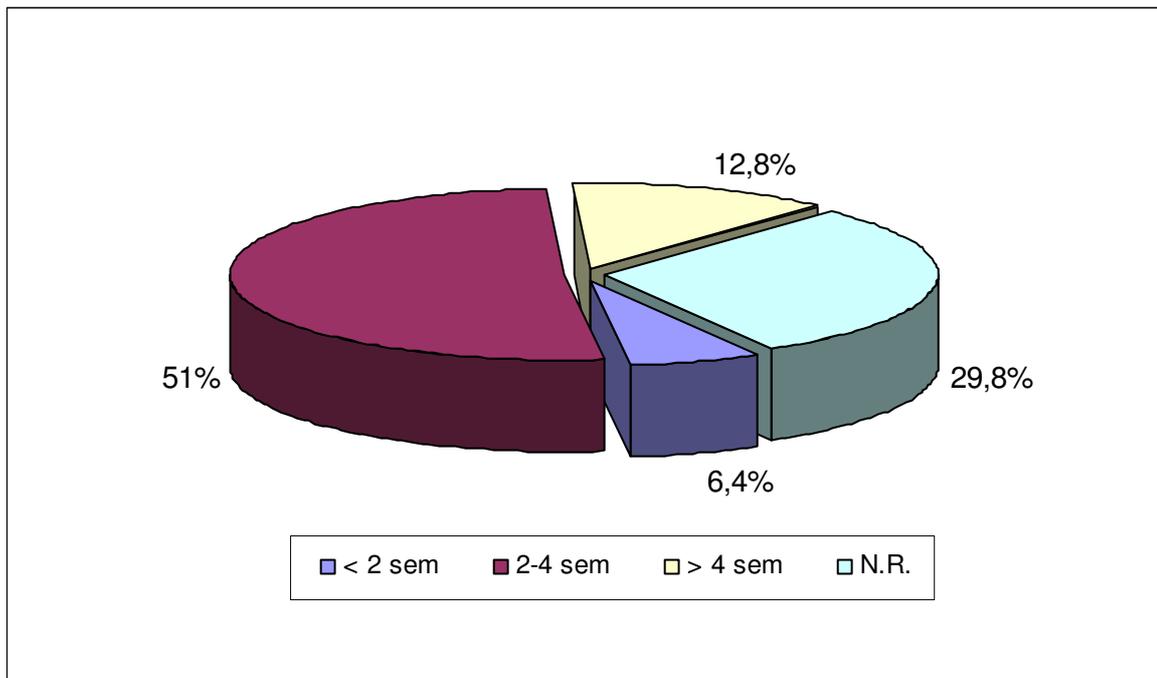
#### **1.1. ANIMALES AFECTADOS**

En la toma de muestras del estudio pudo observarse que la presentación de la enfermedad fue a manera de epizootias (Figura 1), afectando tanto a centros de crianza alpaquera poco tecnificadas (comunidades alpaqueras de Ccaicco y Picotani) como a centros de crianza alpaquera tecnificadas (fundo alpaquero privado y estación experimental IVITA). Los porcentajes de mortalidad neonatal estimados fueron de 50% (n=100 aprox.) en la comunidad alpaquera de Ccaicco, 25% (n=100 aprox.) en la estación experimental IVITA y 25% (n=200 aprox.) en el fundo alpaquero privado.

En la distribución etarea de los animales muestreados, 6.4% (3/47) fueron animales menores de 2 semanas, 51% (24/47) animales entre 2 y 4 semanas, 12.8% (6/47) animales mayores de 4 semanas, y en 29.8% (14/47) la edad no fue registrada (Figura 2).



**Figura 1:** Alpacas neonatas muertas durante una epizootia de enterotoxemia ocurrida en la comunidad alpaquera de Ccaicco, año 2005.



**Figura 2:** Distribución porcentual de los grupos etareos de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia (n=47). N.R.=No Registrado.

## 1.2. SÍGNOS CLÍNICOS

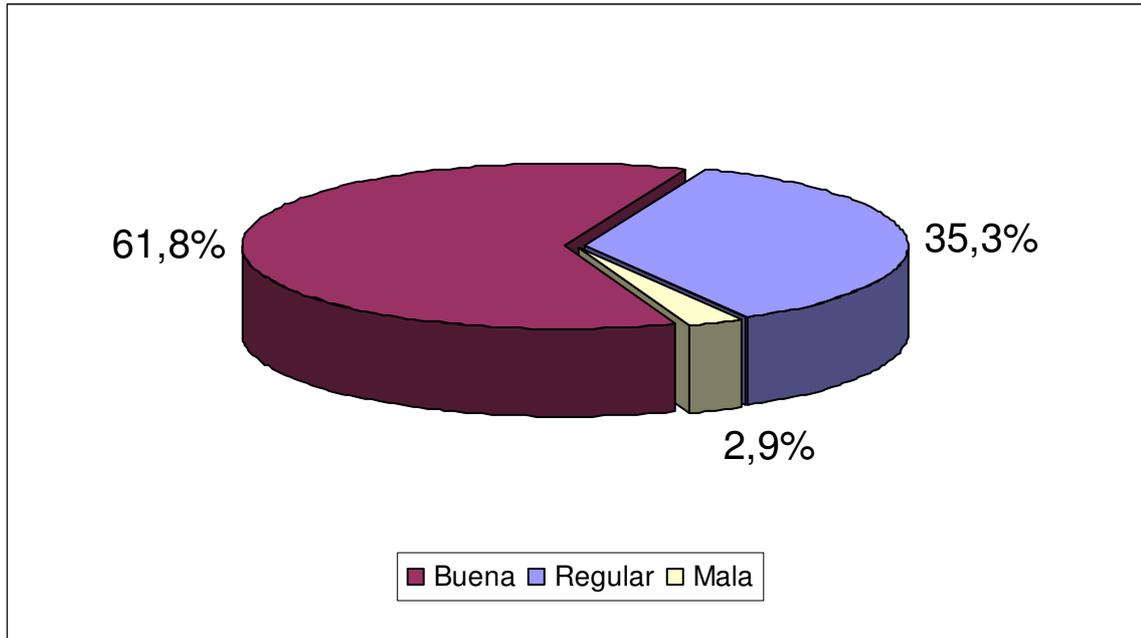
El 48.9% (23/47) de los animales muestreados tuvieron como único signo clínico a la muerte súbita (animales que durante el día anterior no mostraban ningún signo clínico pero a la mañana siguiente eran encontrados muertos). En el 51.1% (24/47) se pudo evidenciar postración, decaimiento, inapetencia, abdomen distendido, emisión de gemidos (probablemente debido a cólicos), y finalmente, la muerte a las pocas horas. Dentro de estos, 33.3% (8/24) manifestaron además signos nerviosos como opistótonos (Figura 3) y convulsiones. En ninguno de los animales muestreados se observó diarrea; sin embargo, algunos evidenciaron constipación.



**Figura 3:** Alpaca neonata perteneciente a la comunidad alpaquera de Ccaicco mostrando signo nervioso de opistótono.

## LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS

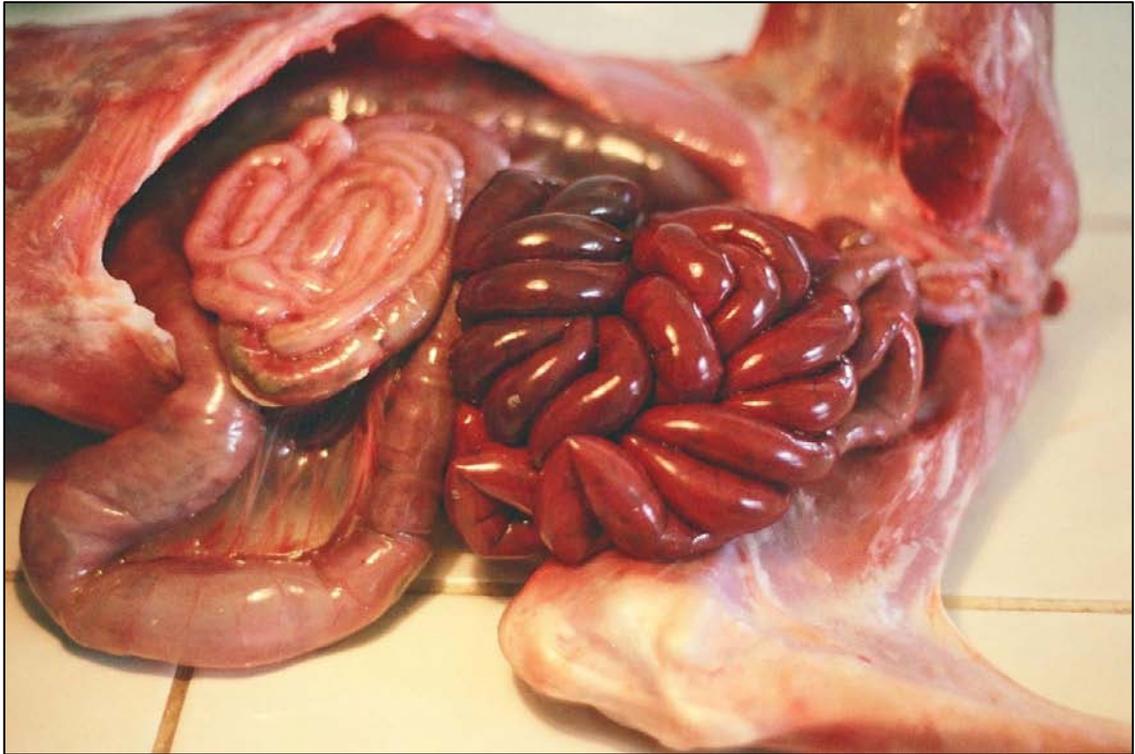
Para la descripción de lesiones anatomopatológicas, sólo 34/47 de los animales muestreados fueron examinados mediante necropsias. La condición corporal de estos animales fue buena en el 61.8% (21/34), regular en el 35.3% (12/34) y mala en el 2.9% (1/34) (Figura 4).



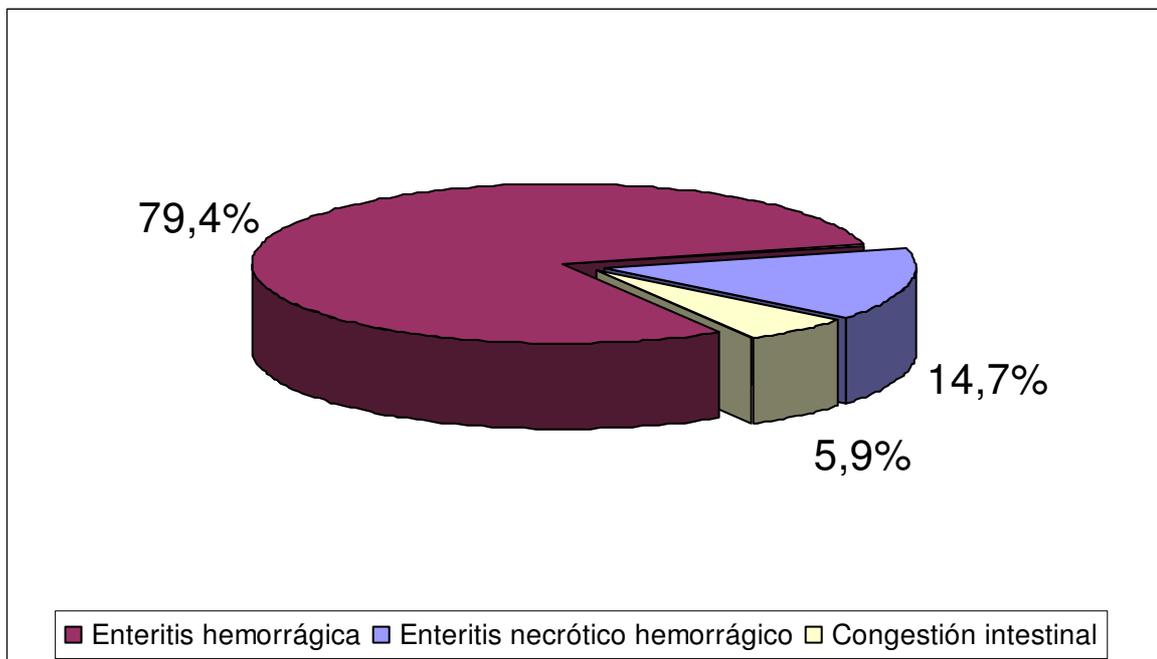
**Figura 4:** Distribución porcentual de la condición corporal de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia (n=34).

Las lesiones anatomopatológicas encontradas en intestino delgado correspondieron a una moderada a severa congestión intestinal con contenido hemorrágico (enteritis hemorrágica) (Figura 5) en 79.4% (27/34) de los casos, y en 14.7% (5/34) se logró observar adicionalmente evidencias de tejido ennegrecido con notorio desprendimiento de la mucosa (enteritis necrótica hemorrágica), y sólo moderada congestión intestinal en el 5.9% (2/34) de los casos (Figura 6). Todos estos se encontraron moderada a severamente distendidos debido a la presencia de gas.

Los ganglios linfáticos mesentéricos se mostraron incrementados de tamaño, congestionados, y en algunos casos con hemorragias focales evidenciadas en la superficie de corte.



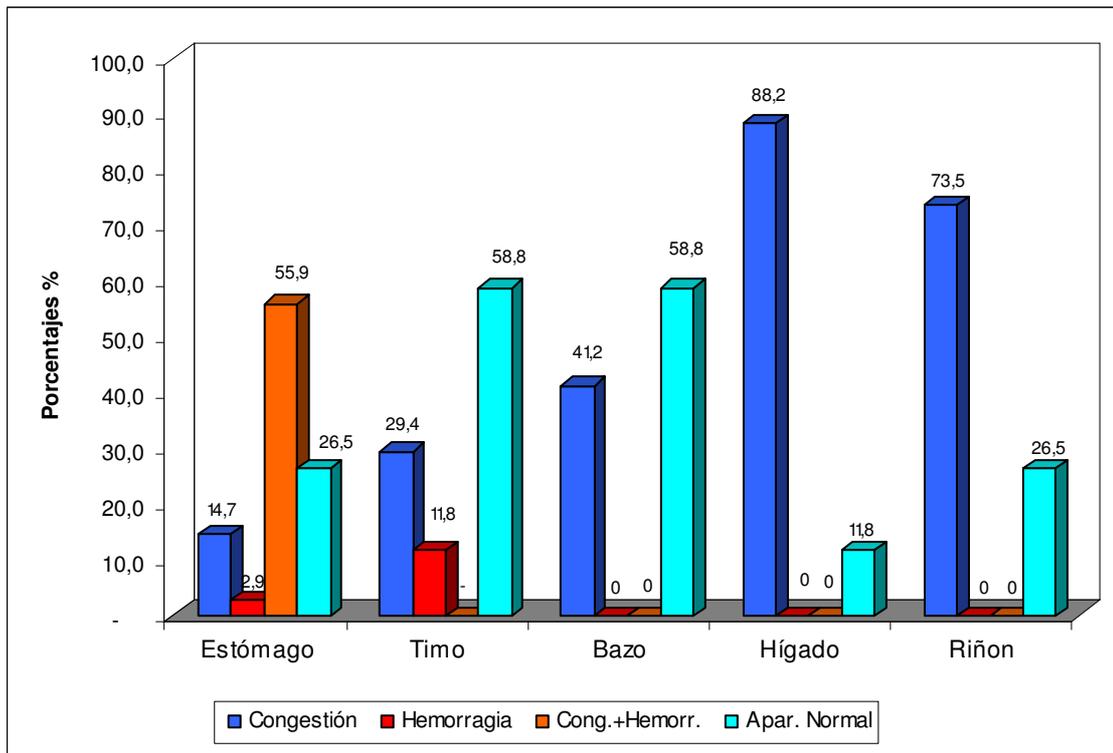
**Figura 5:** Lesiones macroscópicas de una alpaca neonata muerta por enterotoxemia en el fundo alpaquero privado. Nótese el intestino delgado distendido con un severo cuadro congestivo y hemorrágico.



**Figura 6:** Distribución porcentual de lesiones anatomopatológicas encontradas en intestino delgado de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia (n=34).

En la porción glandular del estómago, 55.9% (19/34) de los casos presentó congestión y hemorragia, 14.7% (5/34) congestión, 2.9% (1/34) hemorragia y 26.5% (9/36) sin lesiones algunas. Además, algo frecuentemente encontrado en los compartimentos estomacales fue la presencia de arcilla, arena y piedrecillas, las cuales confirieron un color grisáceo a su contenido. Asimismo, en muchos casos, en el extremo distal del colon pudo evidenciarse concreciones de fecas secas, que obstaculizaban la luz del lumen intestinal.

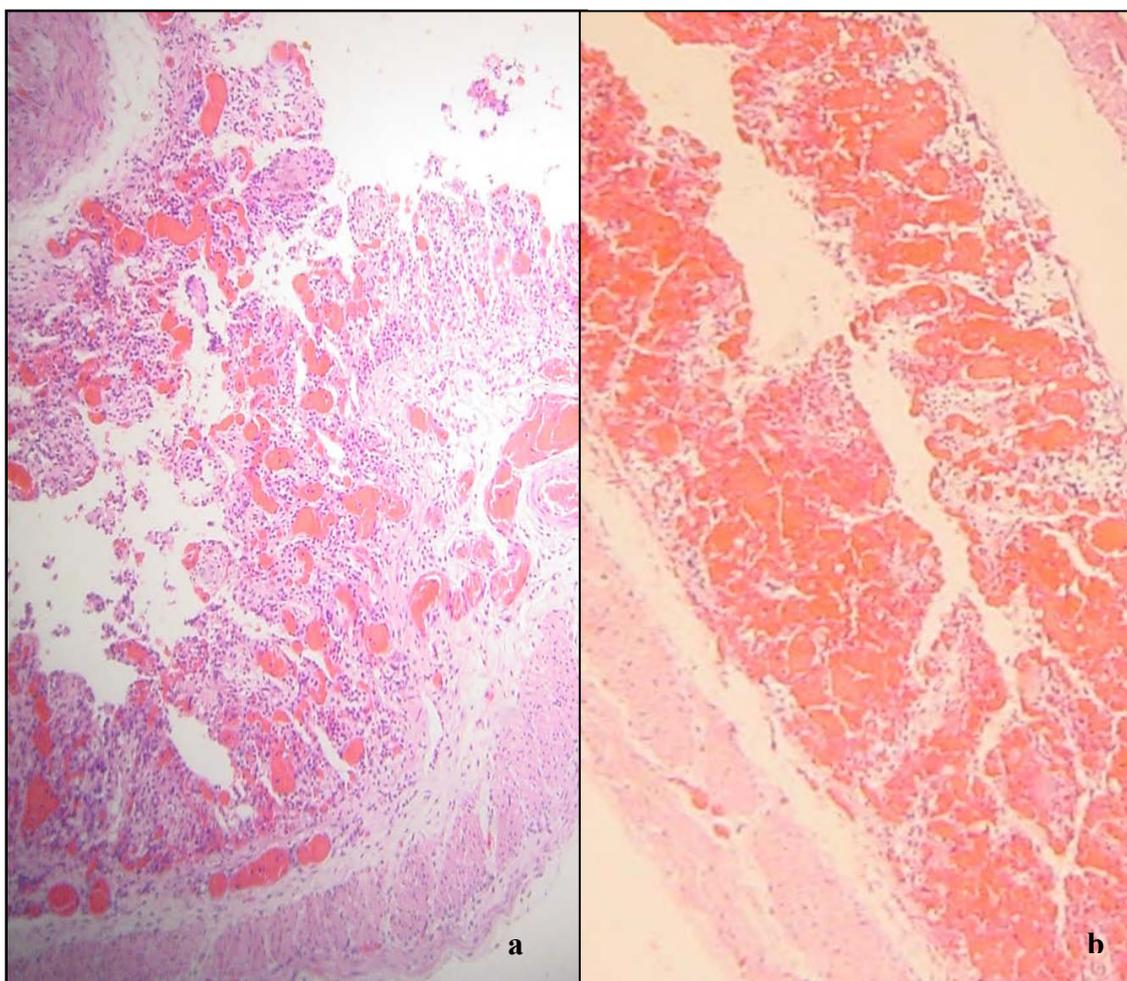
En el timo, 29.4% (10/34) de los casos presentó congestión, 11.8% (4/34) hemorragias petequiales superficiales, y 58.8% (20/34) sin lesiones aparentes. Mientras, el bazo, hígado y riñón mostraron solamente un cuadro congestivo en 41.2% (14/34), 88.2% (30/34) y 73.5% (25/34), respectivamente (Figura 7). Además, en 52.9% (18/34) de los animales los pulmones evidenciaron zonas de congestión con hepatización roja compatibles con focos neumónicos.



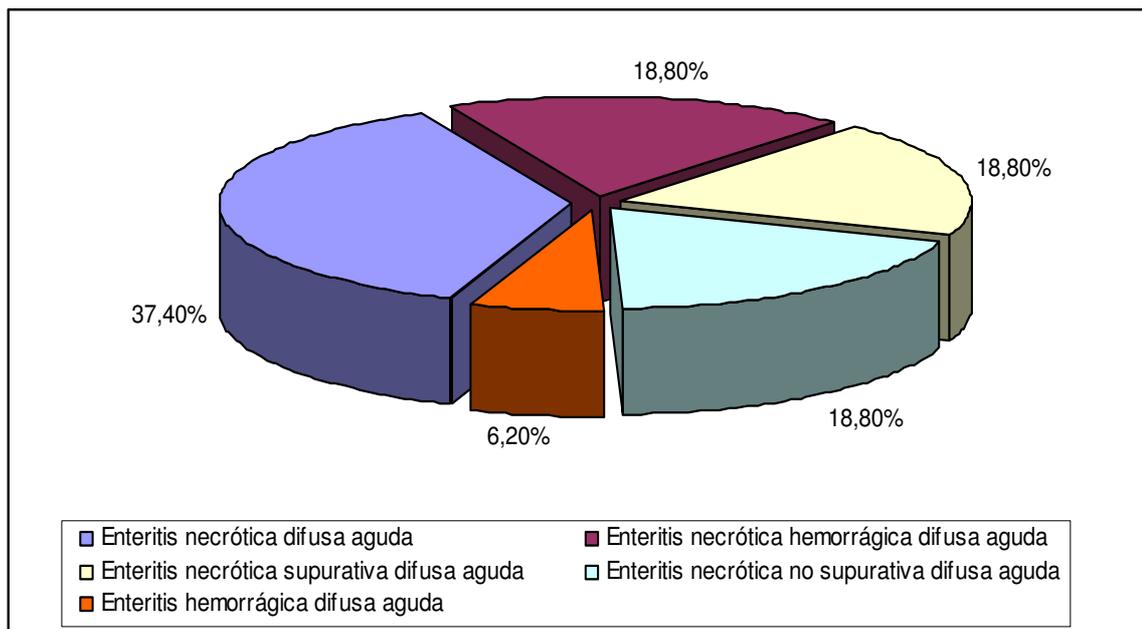
**Figura 7:** Distribución porcentual de lesiones anatomopatológicas encontradas en estómago, timo, bazo, hígado y riñón de las alpacas muestreadas muertas por enterotoxemia (n=34).

#### 1.4. LESIONES HISTOPATOLÓGICAS

Para la descripción de lesiones histopatológicas (Figura 9), muestras de intestino delgado de 16/47 animales muestreados fueron evaluadas microscópicamente. En 37.4% (6/16) de los casos se observó una severa enteritis necrótica difusa aguda (Figura 8a), en 18.8% (3/16) de moderada a severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda en 18.8% (3/16) de moderada a severa enteritis necrótica supurativa difusa aguda, en 18.8% (3/16) una severa enteritis necrótica no supurativa y en 6.2% (1/16) una severa enteritis hemorrágica difusa aguda (Figura 8b). También se evidenció una moderada a severa congestión en la submucosa intestinal en las muestras examinadas.

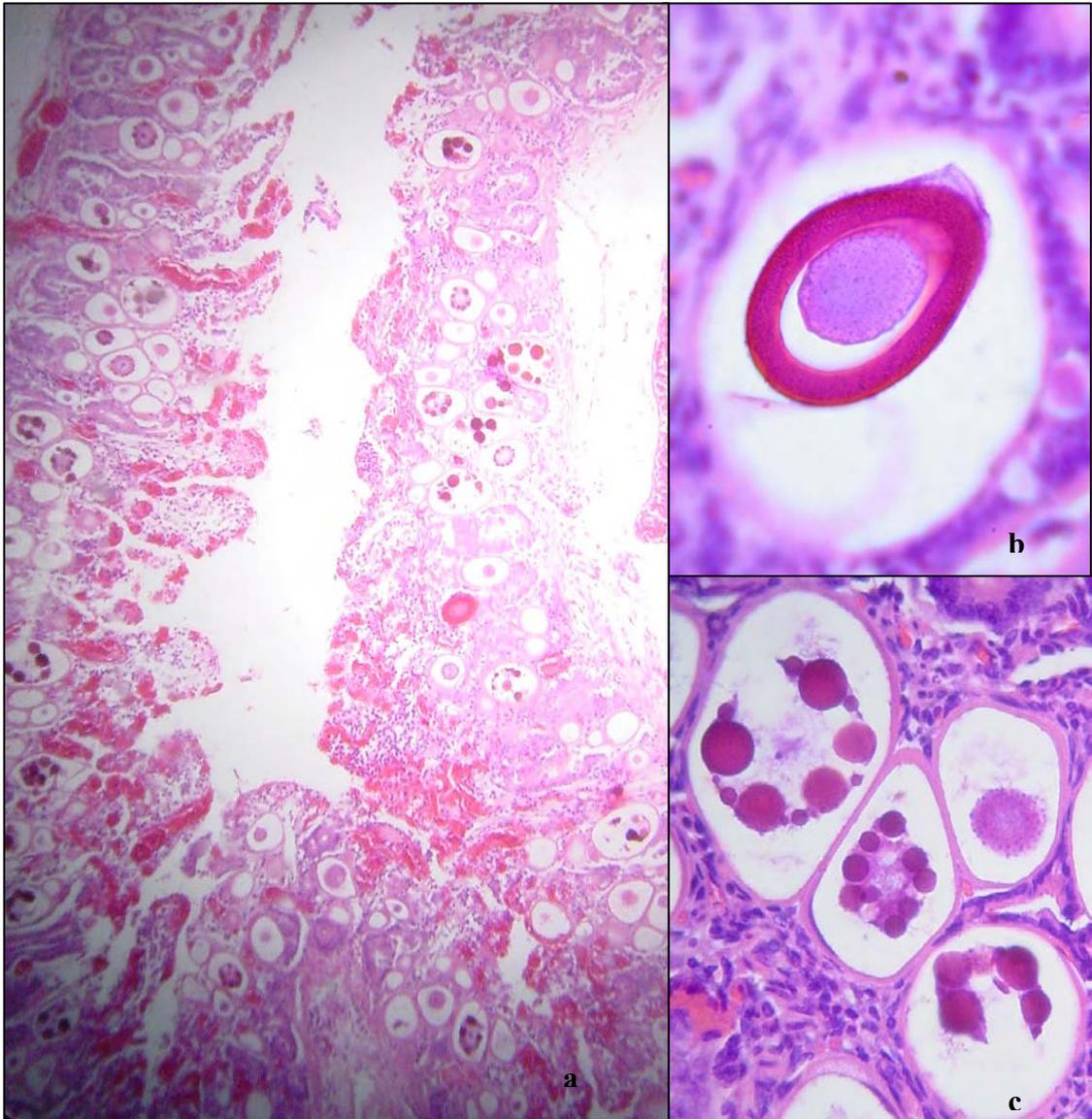


**Figura 8:** Alteraciones histopatológicas en intestino delgado de alpacas muertas por enterotoxemia. Se muestra: a) Severa enteritis necrótica difusa aguda con desprendimiento de mucosa intestinal y severa congestión de los vasos en la submucosa intestinal (10X-Tinción H.E.) y b) Severa enteritis hemorrágica difusa aguda, nótese el severo grado de infiltración de eritrocitos en la mucosa intestinal (10X-Tinción H.E.).



**Figura 9:** Distribución porcentual de lesiones histopatológicas encontradas en intestino delgado de animales muertos por enterotoxemia (n=16).

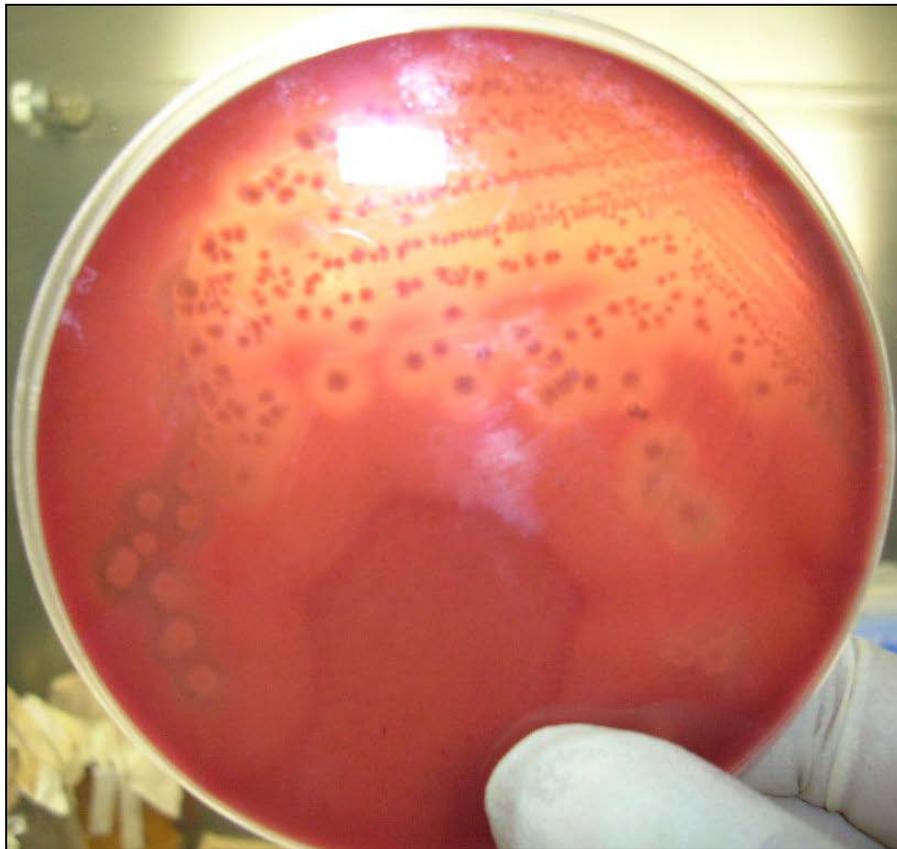
Interesantemente, en 43.8% (7/16) de las muestras evaluadas se identificaron también estadios sexuales y asexuales de parásitos tipo coccidia, incluyendo esquizontes, microgametos, macrogamontes y ooquistes, ubicados profundamente en la mucosa intestinal. Todas estas de acuerdo a las características morfológicas del macrogamonte (6 a 7 cuerpos de inclusión eosinófilos de forma ovoide de aproximadamente 13 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro) (Rosadio y Ameghino, 1994; Palacios *et al.*, 2004; Palacios *et al.*, 2006) y del ooquiste (estructura piriforme de gruesa membrana y de tamaño aproximado de 90 a 60  $\mu\text{m}$ ) (Rosadio y Ameghino, 1994; Leguia y Casas, 1999), fueron considerados estadios pertenecientes a *Eimeria macusaniensis*. (Figura 10). La presencia de este parásito estuvo asociado a cambios patológicos caracterizados por severa enteritis necrótica difusa aguda en 42.9% (3/7), severa enteritis necrótica supurativa difusa aguda en 28.5% (2/7), severa enteritis no supurativa difusa aguda en 14.3% (1/7) y severa enteritis hemorrágica difusa aguda en 14.3% (1/7) de los casos positivos. Estas asociaciones patológicas con *E. macusaniensis* se visualizaron en animales de procedencia de los centros de crianza de alpacas de la comunidad alpaquera de Ccaicco (n=3) y del fundo alpaquero privado (n=4) (ver apéndice 2).



**Figura 10:** Lesiones entéricas en alpacas muertas por enterotoxemia asociadas a *E. macusaniensis*. a) Severa enteritis necrótica hemorrágica con presencia de varios estadios sexuales y asexuales de *E. macusaniensis* en mucosa intestinal (10X-Tinción H.E.). b) Ooquiste no esporulado de *E. macusaniensis* de característica forma piriforme y de gruesa pared (40X-Tinción H.E.). c) Macrogamontes de *E. macusaniensis* con 5 a 8 cuerpos de inclusión de distintos tamaños (40X-Tinción H.E.).

## 2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *C. perfringens*

De los 47 animales muestreados con diagnóstico de enterotoxemia se lograron obtener 47 aislamientos de *C. perfringens*, un aislamiento por cada animal. Estos aislamientos fueron identificados como *C. perfringens* (Cuadro 5) en base a su característica de crecimiento en condiciones de anaerobiosis, a la morfología de sus colonias y primordialmente, a su patrón hemolítico (hemólisis completa e incompleta) característico del *C. perfringens* en agar sangre (Figura 11), a la ausencia de actividad catalasa, a su morfología bacilar y positividad a la coloración Gram evidenciada a la observación microscópica (Figura 12).



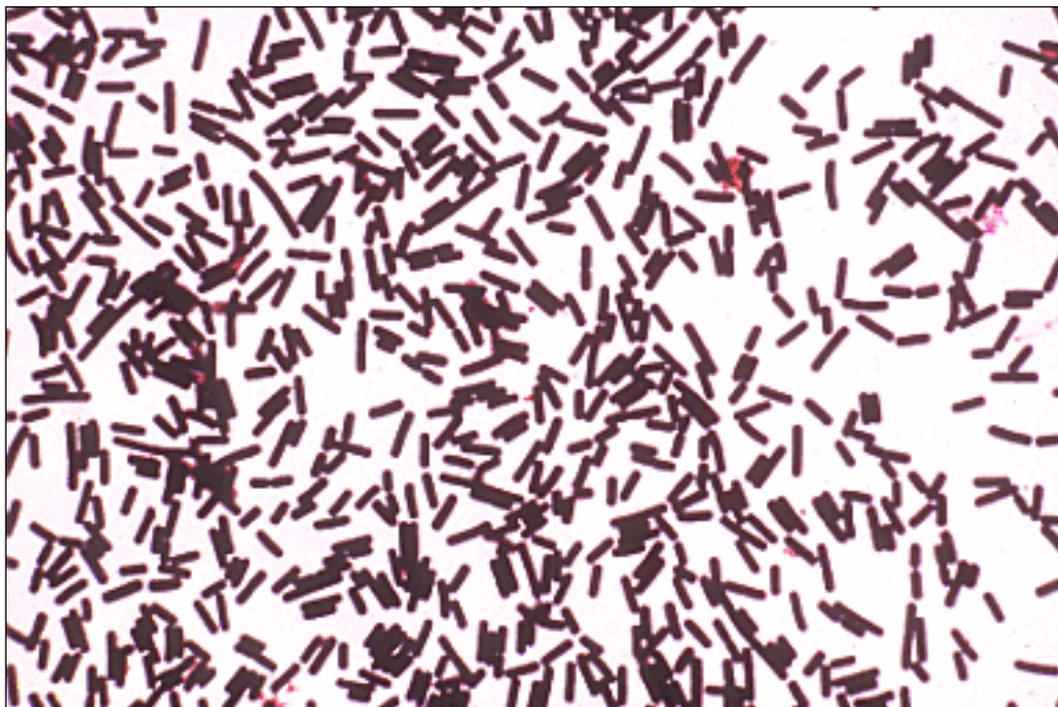
**Figura 11:** Patrón hemolítico característico de *C. perfringens* en agar sangre. Nótese los halos interno (hemólisis completa) y externo (hemólisis incompleta).

**Cuadro 5:** Características tintoriales, hemolíticas y bioquímicas de los *C. perfringens* aislados de animales muertos por enterotoxemia.

Nº	Código	Tinción Gram	Doble hemólisis	Reducción Sulfito	Actividad lecitinasasa	Prueba catalasa
1	CAC 1	Bacilo G+	+	+	+	-
2	CAC 2	Bacilo G+	+	N.D.	+	-
3	CAC 3	Bacilo G+	+	-	+	-
4	CAC 4	Bacilo G+	+	+	+	-
5	CAC 5	Bacilo G+	+	+	+	-
6	CAC 6	Bacilo G+	+	-	+	-
7	CAC 7	Bacilo G+	+	+	+	-
8	CAC 8	Bacilo G+	+	+	+	-
9	CAC 9	Bacilo G+	+	+	+	-
10	EEI 1	Bacilo G+	+	+	+	-
11	EEI 2	Bacilo G+	+	+	+	-
12	EEI 3	Bacilo G+	+	-	+	-
13	EEI 4	Bacilo G+	+	+	+	-
14	EEI 5	Bacilo G+	+	+	+	-
15	EEI 6	Bacilo G+	+	+	+	-
16	CAP 1	Bacilo G+	+	-	+	-
17	CAP 2	Bacilo G+	+	-	+	-
18	CAP 3	Bacilo G+	+	+	+	-
19	CAP 4	Bacilo G+	+	-	+	-
20	CAP 5	Bacilo G+	+	-	+	-
21	CAP 6	Bacilo G+	+	-	+	-
22	CAP 7	Bacilo G+	+	N.D.	N.D.	-
23	CAP 8	Bacilo G+	+	+	+	-
24	CAP 9	Bacilo G+	+	N.D.	+	-
25	CAP 10	Bacilo G+	+	+	+	-
26	FAP 1	Bacilo G+	+	+	+	-
27	FAP 2	Bacilo G+	+	+	+	-
28	FAP 3	Bacilo G+	+	N.D.	N.D.	-
29	FAP 4	Bacilo G+	+	+	+	-
30	FAP 5	Bacilo G+	+	N.D.	N.D.	-
31	FAP 6	Bacilo G+	+	+	+	-
32	FAP 7	Bacilo G+	+	-	N.D.	-
33	FAP 8	Bacilo G+	+	+	+	-
34	FAP 9	Bacilo G+	+	N.D.	N.D.	-
35	FAP 10	Bacilo G+	+	+	+	-
36	FAP 11	Bacilo G+	+	+	+	-
37	FAP 12	Bacilo G+	+	+	+	-
38	FAP 13	Bacilo G+	+	-	+	-
39	FAP 14	Bacilo G+	+	-	N.D.	-
40	FAP 15	Bacilo G+	+	+	+	-
41	FAP 16	Bacilo G+	+	-	+	-
42	FAP 17	Bacilo G+	+	+	+	-
43	FAP 18	Bacilo G+	+	+	+	-

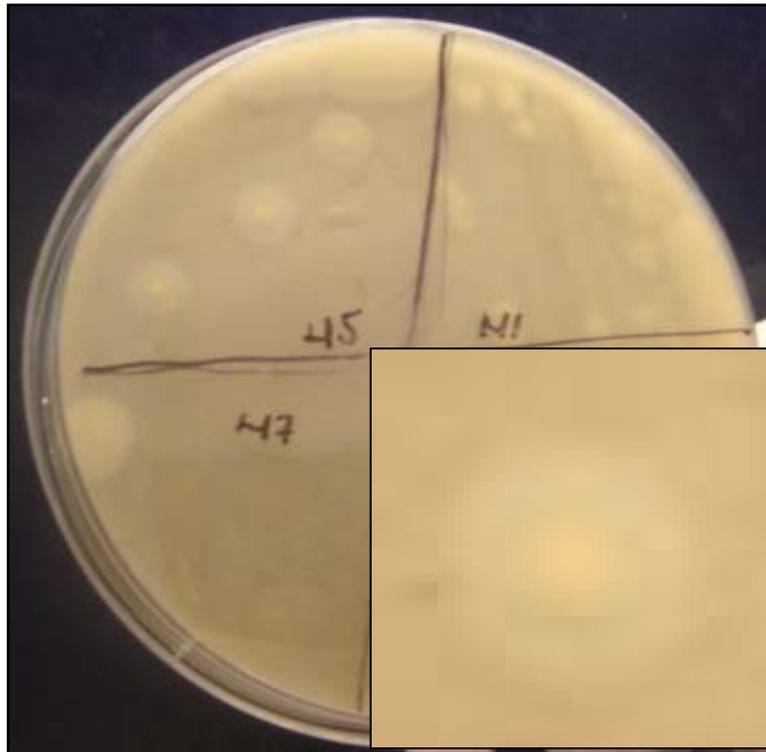
N°	Código	Tinción Gram	Doble hemólisis	Reducción Sulfito	Actividad lecitinasa	Prueba catalasa
44	FAP 19	Bacilo G+	+	-	+	-
45	FAP 20	Bacilo G+	+	-	+	-
46	FAP 21	Bacilo G+	+	+	+	-
47	FAP 22	Bacilo G+	+	+	+	-

N.D. = No Determinado; (+) = Positivo; (-) = Negativo.



**Figura 12:** Morfología bacilar y positividad a la tinción Gram del *C. perfringens*.

Asimismo, 41 aislamientos de *C. perfringens* fueron sembrados en agar yema de huevo, todos los cuales mostraron Reacción de Nagler, debido a la presencia y actividad lecitinasa de la toxina  $\alpha$  del *C. perfringens* (Figura 13). También, 41 aislamientos de *C. perfringens* fueron sembrados en agar TSC, de los cuales sólo 65.9% (27/41) mostraron capacidad de reducción de sulfito (Figura 14), el resto presentó crecimiento de colonias sin coloración negruzca.



**Figura 13:** Reacción de Nagler del *C. perfringens* sobre agar yema de huevo. Nótese la zona nublosa alrededor de las colonias producida por la actividad lecitinasas de la toxina  $\alpha$ .



**Figura 14:** Positividad a la reducción de sulfito del *C. perfringens* en agar TSC. Nótese las colonias de color negruzco.

### 3. EXTRACCIÓN DE ADN DE LOS AISLAMIENTOS DE *C. perfringens*

El ADN extraído de los 47 aislamientos de *C. perfringens* mostró tener buena concentración de ADN ( $\cong 50$  ng/ $\mu$ l) y ser de buena calidad (no degradado y sin impurezas) (Figura 15). El ADN de los aislamientos que presentaron degradación e impurezas se volvió a extraer.



**Figura 15:** Calidad y cantidad del ADN extraído de los *C. perfringens* aislados. Nótese, la flecha señala banda (línea 1; marcador de peso molecular  $\lambda$  DNA *Hind* III), que indica una concentración aproximada de 50 ng de ADN/ $\mu$ l; línea 1-10, ADN de aislamientos de *C. perfringens* con concentraciones aproximadas a 50 ng de ADN/ $\mu$ l.

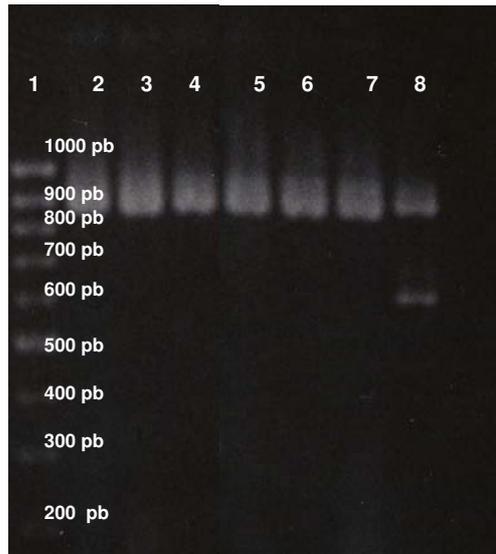
### 4. PCR MÚLTIPLE

El ADN de *C. perfringens* tipo A (control positivo) evidenció un amplicón de 900 pb correspondiente al gen *cpa* (genotipo A) y el ADN de *C. perfringens* tipo C (control positivo) evidenció amplicones de 900 y 610 pb correspondientes a los genes *cpa* y *cpb*, respectivamente (genotipo C) (Figura 16). Mientras, los ADNs de *C. chauvoei* y *C. septicum* (controles negativos) no evidenciaron ningún amplicón (Cuadro 6) (Figura 17).

**Cuadro 6:** Genotipos y subtipos de controles positivos (*C. perfringens* (CECT 563 y CECT 820)), y negativos (*C. chauvoei* y *C. septicum*).

Cepas	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	Genotipo	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>	Subtipo
CECT 563	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpē cpb2̄</i>
CECT 820	+	+	-	-	C	-	-	<i>cpē cpb2̄</i>
<i>C. chauvoei</i>	-	-	-	-	N.G.	-	-	N.S.
<i>C. septicum</i>	-	-	-	-	N.G.	-	-	N.S.

(+) = Presencia del gen; (-) = Ausencia de gen; N.G.=Ningún genotipo; N.S.=Ningún subtipo

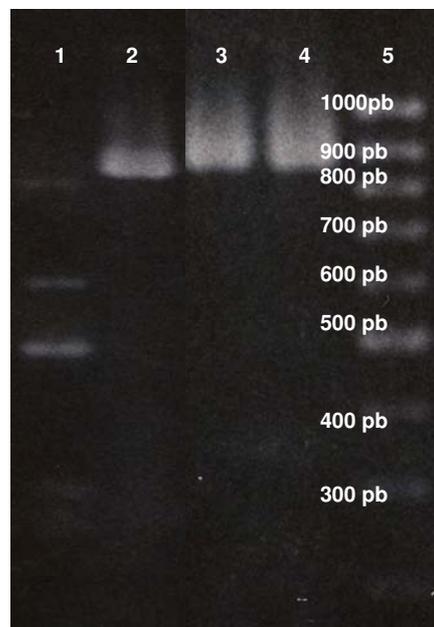


**Figura 16:** Productos PCR Múltiple de aislamientos de *C. perfringens* y cepas controles positivas en gel de agarosa al 2%. Línea 1, marcador de peso molecular 100 pb *DNA ladder*; líneas 2-6 (aislamientos CAC2, CAC3, CAC4, EEI4, EEI5) corresponden al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ ; línea 7, *C. perfringens* tipo A (cepa CECT 563) corresponde al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ ; línea 8, *C. perfringens* tipo C (cepa CECT 820) corresponde al genotipo C subtipo  $cpe^-cpb2^-$



**Figura 17:** Productos de PCR Múltiple de los aislamientos de *C. perfringens* y controles negativos en gel de agarosa al 2%. Línea 1, marcador de peso molecular 1 kb DNA; línea 10, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; línea 2-4 (aislamientos FAP4, FAP5, FAP6), 9 (aislamiento FAP13), 12-16 (aislamientos FAP18, FAP19, FAP20, FAP21, FAP22), corresponden al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^+$ ; línea 5-7 (aislamientos CAC1, EEI2, CAP5), corresponden al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ ; línea 8 (cepa de *C. chauvoei*) y línea 17 (cepa de *C. septicum*) no corresponden a ningún genotipo ni subtipo.

El ADN de cada uno de los 47 aislamientos de *C. perfringens* fue sometido a la técnica PCR Múltiple, cuyos resultados se encuentran descritos en el cuadro 7. En todos los aislamientos se evidenció un amplicón de 900 pb correspondiente al gen *cpa* (Figuras 16 y 17). Además, 13 aislamientos evidenciaron un amplicón de 200 pb correspondiente al gen *cpb2* (Figura 17), y 1 aislamiento evidenció amplicones de 610 pb y 500 pb correspondientes a los genes *cpb* y *cpe*, respectivamente (Figura 18). Sin embargo, ningún aislamiento evidenció amplicones de 293 y 396 pb correspondientes a los genes *etx* e *iap*, respectivamente.



**Figura 18:** Productos PCR Múltiple de aislamientos de *C. perfringens* en gel de agarosa al 2%. Línea 1 (aislamiento CAC9) corresponde a genotipo C subtipo  $cpe^+cpb2^-$ ; línea 2-4 (aislamientos EEI1, EEI2, EEI3) corresponden al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ ; línea 5, marcador de peso molecular 100 pb DNA.

**Cuadro 7:** Genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de crías muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

N°	Código	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	Genotipo	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>	Subtipo
1	CAC 1	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
2	CAC 2	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
3	CAC 3	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
4	CAC 4	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
5	CAC 5	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
6	CAC 6	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
7	CAC 7	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
8	CAC 8	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
9	CAC 9	+	+	-	-	C	+	-	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
10	E EI 1	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
11	E EI 2	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
12	E EI 3	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
13	E EI 4	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
14	E EI 5	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
15	E EI 6	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
16	CAP 1	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
17	CAP 2	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
18	CAP 3	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
19	CAP 4	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
20	CAP 5	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
21	CAP 6	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
22	CAP 7	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
23	CAP 8	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
24	CAP 9	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
25	CAP 10	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
26	FAP 1	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
27	FAP 2	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
28	FAP 3	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
29	FAP 4	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
30	FAP 5	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
31	FAP 6	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
32	FAP 7	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
33	FAP 8	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
34	FAP 9	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
35	FAP 10	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
36	FAP 11	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
37	FAP 12	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
38	FAP 13	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
39	FAP 14	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
40	FAP 15	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
41	FAP 16	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>

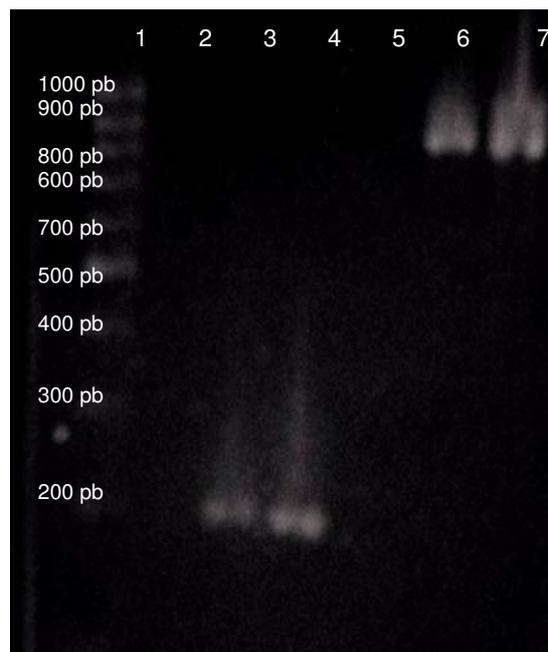
Nº	Código	<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	Genotipo	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>	Subtipo
42	FAP 17	+	-	-	-	A	-	-	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>
43	FAP 18	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
44	FAP 19	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
45	FAP 20	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
46	FAP 21	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
47	FAP 22	+	-	-	-	A	-	+	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>

(+) = Presencia del gen; (-) = Ausencia del gen

## 5. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR MÚLTIPLE

Para determinar si los amplicones evidenciados a la vez de 900 y 200 pb correspondientes a los genes *cpa* y *cpb2* no fueron fragmentos de ADN inespecíficos (formados durante las fases de desnaturalización, hibridación y extensión del ADN en la reacción de la polimerasa con múltiples iniciadores), que pudiesen dar un genotipo y subtipo errado, se realizó PCR simples tanto para el gen *cpa* como para el gen *cpb2* a las muestras de ADN de dos aislamientos de *C. perfringens* genotipo A subtipo *cpe*<sup>-</sup>*cpb2*<sup>+</sup>. Las PCR simples fueron realizadas con las mismas condiciones descritas un para la PCR Múltiple, cuya única diferencia radicó en que cada reacción contuvo los iniciadores necesarios para detectar sólo un gen.

En las PCR simples para el gen *cpa* se evidenció únicamente un amplicón de 900 pb correspondiente al gen *cpa* y en las PCR simples para el gen *cpb2* se evidenció únicamente un amplicón de 200 pb correspondiente al gen *cpb2* (Figura 19). Así, se confirmó el genotipo y subtipo obtenido por PCR Múltiple, descartando la formación de fragmentos de ADN inespecíficos durante su procesamiento.



**Figura 19:** Productos de PCR Simple para la detección del gen *cpa* (línea 2-4) y productos de PCR Simple para la detección del gen *cpb2* (línea 5-7) de *C. perfringens* en gel de agarosa al 2%. Línea 1, marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; línea 2, control negativo; línea 3-4 (aislamientos FAP4 y FAP5), corresponden a amplicones para el gen *cpb2* ; línea 5, control negativo; línea 6-7 (aislamientos FAP4 y FAP5), corresponden a amplicones para el gen *cpa*.

## 6. GENOTIPOS Y SUBTIPOS DE LOS AISLAMIENTOS DE *C. perfringens*

Los genotipos de los *C. perfringens* aislados de casos de enterotoxemia de alpacas, correspondieron en 97.9% (46/47) al genotipo A y sólo en 2.1% (1/47) al genotipo C. Con respecto a los subtipos, 70.2% (33/47) correspondieron al subtipo  $cpe^-cpb2^-$ , 27.7% (13/47) correspondieron al subtipo  $cpe^-cpb2^+$ , y sólo 2.1% (1/47) correspondieron al subtipo  $cpe^+cpb2^-$ , el cual perteneció al único genotipo C encontrado. Estos resultados se encuentran resumidos en el cuadro 8

La distribución de los genotipos de los *C. perfringens* aislados de casos enterotoxémicos según departamentos (Cuadro 9), muestran al genotipo A como el genotipo más frecuente en los departamentos de Cusco y Puno con porcentajes de 93.3% (14/15) y 100% (32/32), respectivamente. Además, en el departamento de Cusco se encontró al único genotipo C aislado. Asimismo, el subtipo  $cpe^-cpb2^-$  fue el más frecuente en los departamentos de Cusco y Puno con porcentajes de 93.3% (14/15) y 59.4% (19/32), respectivamente. Otros subtipos encontrados fueron el subtipo  $cpe^-cpb2^+$  con porcentajes de 40.6% (13/32) en el departamento de Puno y el subtipo  $cpe^+cpb2^-$  con porcentajes de 6.7% (1/15) en el departamento de Cusco.

La distribución de los genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de casos enterotoxémicos según centros de crianza alpaquera (Cuadro 10) muestra que todos los aislamientos obtenidos de la estación experimental IVITA (6/6), de la comunidad alpaquera de Picotani (10/10), y casi todos, de la comunidad alpaquera de Ccaicco (8/9) correspondieron al genotipo A subtipo  $cpe^-cpb2^-$ . Además, en la comunidad alpaquera de Ccaicco pudo ser obtenido un aislamiento (1/9) perteneciente al genotipo C subtipo  $cpe^+cpb2^-$ . En contraste, en el fundo alpaquero privado todos los aislamientos (22/22) pertenecieron al genotipo A, de los cuales 59.4% (13/22) correspondieron al subtipo  $cpe^-cpb2^+$  y 40.6 % (9/22) al subtipo  $cpe^-cpb2^-$ .

**Cuadro 8:** Frecuencias y porcentajes de los genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

GENOTIPO	A			B			C			D			E		
Número de aislados	46/47			0/47			1/47			0/47			0/47		
(%)	(97.9)			(0)			(2.1)			(0)			(0)		
SUBTIPO	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
Número de aislados	33/47	0/47	13/47	0/47	0/47	0/47	0/47	1/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47	0/47
(%)	(70.2)	(0)	(27.7)	(0)	(0)	(0)	(0)	(2.1)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

**Cuadro 9:** Distribución de frecuencias y porcentajes según departamentos de los genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

Departamento	CUSCO		PUNO	
GENOTIPO	A	C	A	
Número de aislados	14/15	1/15	32/32	
(%)	(93.3)	(6.7)	(100)	
SUBTIPO	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>+</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>-</sup>	<i>cpe</i> <sup>-</sup> <i>cpb2</i> <sup>+</sup>
Número de aislados	14/15	1/15	19/32	13/32
(%)	(93.3)	(6.7)	(59.4)	(40.6)

**Cuadro 10:** Distribución de frecuencias y porcentajes según centros de crianza de alpacas de los genotipos y subtipos de *C. perfringens* aislados de crías de alpacas muertas por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

Departamento	CUSCO			PUNO		
	Comunidad alpaquera de Ccaicco		Estación experimental IVITA	Comunidad alpaquera de Picotani	Fundo Alpaquero Privado	
GENOTIPO	A	C	A	A	A	
Número de aislados	8/9	1/9	6/6	10/10	22/22	
(%)	(88.9)	(11.1)	(100)	(100)	(100)	
SUBTIPO	$cpe^-$ $cpb2^-$	$cpe^+$ $cpb2^-$	$cpe^-$ $cpb2^-$	$cpe^-$ $cpb2^-$	$cpe^-$ $cpb2^-$	$cpe^-$ $cpb2^+$
Número de aislados	8/9	1/9	6/6	10/10	9/22	13/22
(%)	(88.9)	(11.1)	(100)	(100)	(40.6)	(59.4)

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo genotipificar y subtipificar aislamientos de *C. perfringens* obtenidos de alpacas muertas por enterotoxemia, la enfermedad infecciosa más importante de los camélidos sudamericanos debido a que provoca elevadas tasas de mortalidad neonatal de hasta 70 % en centros de crianza alpaquera en nuestro país (Ramírez *et al.*, 1985); expresándose en la merma de su población e interferencia con los programas de mejoramiento genético.

Para este estudio se muestrearon 47 alpacas pertenecientes a cuatro centros de crianza de alpacas, en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005, en donde la enfermedad se presentó a manera de epizootias con porcentajes de mortalidad neonatal de hasta 50%. Los animales más afectados (51%) fueron aquellos con edades entre 2 a 4 semanas. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por otros autores para la enterotoxemia en alpacas (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Bustinza, 2000).

Casi la mitad de los animales muestreados (48.9%) manifestaron como único signo clínico a la muerte súbita. El resto de los animales (51.1%) manifestaron postración, decaimiento, inapetencia, distensión del abdomen, emisión de gemidos y finalmente, la muerte. Sólo algunos (17%) de ellos mostraron signos nerviosos (opistótonos y convulsiones). Todos estos signos clínicos encontrados coinciden con lo reportado por Moro (1971); Ramírez *et al.*, (1985); Ameghino y De Martini (1991); Fowler (1998); Bustinza, (2000) al describir animales afectados por enterotoxemia.

En las necropsias realizadas, se pudo observar que el 61.8% de los animales examinados tuvieron buena condición corporal, de manera similar a lo señalado por Moro (1987), Ramírez *et al.* (1985), Ameghino y De Martín (1991), Bustinza (2000). En relación a las lesiones anatomopatológicas encontradas, el principal cambio patológico correspondió a una enteritis hemorrágica (79.4%) seguida por una enteritis necrótica hemorrágica (14.7%). Estas lesiones son similares a las encontradas y descritas por Oha (1994) y Palacios (2004). Además, en algunos casos se encontró considerable presencia de arcilla, arena y piedrecillas en los compartimientos estomacales, indicando que los animales en algún momento de la fase clínica de la enfermedad presentaron apetito depravado, corroborando lo observado por varios investigadores de la enfermedad (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Ameghino y De Martini, 1991; Fowler, 1998, Bustinza, 2000), y presumiblemente ocasionado por el daño al sistema nervioso central causado por las toxinas. Asimismo, en muchos casos, en el extremo distal del colon se pudo evidenciar concreciones de heces secas, que obstaculizaban la luz del lumen intestinal, probablemente manifestandose como constipación, otro de los signos clínicos previamente reportados (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985; Fowler, 1998). Estas alteraciones explicarían la hipótesis de que al no ser eliminadas las toxinas por las heces éstas podrían ser absorbidas masivamente, conduciendo al estado de toxemia (Moro, 1971; Ramírez *et al.*, 1985).

A la evaluación microscópica de muestras de intestino delgado, las lesiones histopatológicas halladas correspondieron en su mayoría a severos cuadros de enteritis necrótica (93.8%) y de enteritis hemorrágica (6.2%), siendo estas lesiones similares a las encontradas y descritas por Oha (1994) y Palacios (2004) en crías de alpacas muertas por enterotoxemia.

En 7/16 casos se lograron observar a nivel de la mucosa intestinal formas intracelulares (trofozoitos, esquizontes y macrogamontes) y extracelulares (ooquistes no esporulados) de *E. macusaniensis*. La presencia de similares estructuras en casos de enterotoxemia en alpacas ha sido también observado (Palacios, 2004). Similar asociación patológica de eimerias y *C. perfringens* tipo A, ha sido descrita en cuadros de enteritis necrótica en pollos (Willians, 2005), en donde las eimerias son, al parecer,

un factor desencadenante para el desarrollo de enteritis necrótica. Esta posible asociación de eimeriosis e infecciones clostridiales en alpacas merece ser estudiada.

Todas estas características de epidemiológicas, signos clínicos y lesiones anatomopatológicas e histopatológicas encontrados en los animales muestreados, llevaron al diagnóstico de cuadros altamente compatibles con enterotoxemia de las alpacas. Este diagnóstico fue confirmado posteriormente en el laboratorio por el aislamiento del agente etiológico (*C. perfringens*) en todas las muestras de intestino delgado obtenidos de estos animales.

Estos aislamientos fueron identificados como *C. perfringens* de acuerdo a las características de crecimiento en condiciones de anaerobiosis, morfología bacilar, positividad a la tinción Gram, formación de zona de doble hemólisis, negatividad a la prueba de catalasa, positividad a la Reacción de Nagler. Sin embargo, sólo 65.9% (27/41) de los aislamientos mostraron capacidad de reducción de sulfito y el resto no. Esta incapacidad de reducción de sulfito en medio agar TSC por algunos *C. perfringens* también ha sido reportado por Emswiler *et al.* (1977), quienes encontraron en 21% (12/56) de aislamientos confirmados de *C. perfringens* ser negativos a la reducción de sulfito.

El método de extracción de ADN para los aislamientos de *C. perfringens* usando el kit comercial *DNA Purification Kit* (Wizard<sup>®</sup> Genomic), que incluye una etapa de pre-tratamiento con lisozima para debilitar la gruesa pared celular característica de todas las bacterias Gram positivas, resultaron ser un buen método de extracción de ADN. La utilización de esta metodología nos permitió obtener buenas concentraciones de ADN (50ng/ $\mu$ l) y libre de impurezas, para utilizar la técnica de PCR Múltiple. Asimismo, permitirán realizar otros tipos de técnicas moleculares como RAPD-PCR, REP-PCR, RFLP-PCR que requieren ADNs de calidad y en buenas concentraciones.

La técnica de PCR Múltiple empleada en este estudio utilizó los iniciadores diseñados por Baums *et al.* (2004) para determinar los genotipos de *C. perfringens*, basados en la presencia de los genes (*cpa*, *cpb*, *etx* y *iap*) codificantes de las toxinas principales ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  y  $\iota$ ). Esta misma técnica permitió, además, subtipificar los genotipos

en base a la presencia de los genes *cpe* y *cpb2* codificantes de la CPE y la toxina  $\beta 2$ , respectivamente. Esta metodología resultó ser una herramienta de diagnóstico rápida y confiable para la determinación de genotipos y subtipos de *C. perfringens*, contrastando con los métodos clásicos de tipificación del *C. perfringens* mediante pruebas de seroneutralización *in vivo*, que se sustentan en la letalidad de ratones o por dermonecrosis en cobayos, empleando sobrenadante de cultivos de *C. perfringens*. La técnica molecular tiene ventajas frente a la tipificación clásica, pues esta última se basa en la producción de las toxinas, y la detección no es tan precisa pues es incapaz de detectar niveles bajos de toxinas y/o que los aislamientos no produzcan toxinas en condiciones *in vitro* (Petit *et al.*, 1999; Baums *et al.*, 2004). Además, actualmente los antisueros son cada vez más difíciles de conseguir en el mercado, y las restricciones en el uso de animales de laboratorio en la actualidad limitan enormemente la utilización de la tipificación clásica (Petit *et al.*, 1999).

La utilización de la técnica de PCR para genotipificación y subtipificación de *C. perfringens* tiene sustento en la correspondencia que se encontró entre el fenotipo y genotipo de *C. perfringens* (99.2%) en 131 cepas estudiadas (Songer y Meer, 1996) convirtiendo a la técnica PCR Múltiple como una herramienta que podría fácilmente sustituir a la tipificación clásica. Esta técnica de PCR Múltiple ha empezado a ser empleada por muchos investigadores para dilucidar la participación de dichas toxinas en procesos entéricos en lechones (Kanakaraj *et al.*, 1998; Garmory *et al.*, 2000, Waters *et al.*, 2003), enteritis necrótica en pollos (Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), enterotoxemia en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001, Kalender *et al.*, 2005), enterotoxemia en ciervos (Embury-Hyatt *et al.*, 2005), tiflocolitis en caballos (Herholz *et al.*, 1999), intoxicación de origen alimentaria en humanos y diarreas asociadas a antibióticos en humanos (Sparks *et al.*, 2001).

Los resultados de genotipificación de *C. perfringens* muestran que el 97.9% (46/47) de nuestros aislamientos provenientes de alpacas con diagnóstico de enterotoxemia correspondieron al genotipo A, según la clasificación realizada por Petit *et al.* (1999). Estos hallazgos concuerdan con los resultados encontrados por Moro (1971) y Ramírez (1987), quienes mediante la seroneutralización *in vivo*, indicaron al *C. perfringens* tipo A como principal agente causal de la enterotoxemia de las alpacas.

Sin embargo, el *C. perfringens* tipo A es parte de la flora bacteriana normal del tracto intestinal de las alpacas (Ramírez *et al.*, 1985), sugiriendo que los *C. perfringens* pertenecientes a la flora intestinal serían los involucrados en la patogénesis de la enterotoxemia de las alpacas, desconociéndose las condiciones para que este genotipo se haga patogénico. La posible asociación patogénica entre eimeriosis y *C. perfringens* encontrados en un 73.75% (7/16) de animales muertos por la enfermedad sugieren que daños previos de la mucosa intestinal por eimerias podrían ser uno de estos posibles factores que deberán esclarecerse en futuros estudios.

Estos aislamientos pertenecientes al genotipo A fueron subagrupados en subtipos, siguiendo la clasificación realizada por Garmory *et al.* (2000). Los resultados determinaron que 71.7% (33/46) pertenecieron al subtipo  $cpe^-cpb2^-$  (no  $\beta$ 2-toxigénico ni enterotoxigénico) y el restante (13/46) al subtipo  $cpe^-cpb2^+$  ( $\beta$ 2-toxigénico). Ninguno de estos aislamientos pertenecieron a los subtipos  $cpe^+cpb2^+$  y/o  $cpe^+cpb2^-$  (enterotoxigénicos), es decir, el gen *cpe* no estuvo presente en ninguno de estos, lo que implicaría que la CPE codificada por este gen, no podría ser sintetizada por ninguno de estos aislamientos. Por consiguiente, la CPE no parece ser un factor de virulencia de *C. perfringens* en el desarrollo de la enterotoxemia en los aislados de los animales estudiados. Estos resultados son similares a los encontrados por investigadores americanos, quienes tampoco detectaron la presencia del gen *cpe* en aislamientos de *C. perfringens* provenientes de alpacas con problemas entéricos (Garmory *et al.*, 2000; Baums *et al.*, 2004; Bueschel *et al.*, 2003), algunos de los cuales estuvieron asociados a muerte súbita (posiblemente casos de enterotoxemia) (Sawires y Songer, 2006). Estos mismos resultados han sido corroborados por estudios realizados en otras especies, en donde tampoco se detectó la presencia del gen *cpe* en aislamientos de *C. perfringens* provenientes de casos de enterotoxemia en terneros (Manteca *et al.*, 2002), cabras (Dray, 2004), venados (Embury-Hyatt *et al.*, 2005), corderos (Kalender *et al.*, 2005); así como de cuadros descritos como disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001), enteritis necrótica en pollos (Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005), enteritis necrótica en lechones (Kanakaraj *et al.*, 1998; Garmory *et al.*, 2000, Waters *et al.*, 2003) y tiflocolitis en caballos (Herholz *et al.*, 1999).

La escasa proporción de aislamientos conteniendo el gen *cpe* llama enormemente la atención, pues la enterotoxina (CPE) siempre fue considerada como el principal factor de virulencia del *C. perfringens* en la patogénesis de la enterotoxemia de las alpacas (Ramírez, 1987). Este investigador encontró algunas cepas de *C. perfringens* tipo A, aisladas de casos de enterotoxemia en alpacas, con capacidad de producir la CPE y cuya inoculación en intestino ligado de llama, indujo algunos signos clínicos (postración, ligera lagrimación y congestión de las mucosas) y lesiones (acumulación de líquido y gas) compatibles con enterotoxemia, por lo que atribuyó a la CPE como el principal factor de virulencia involucrado en el desarrollo de la enfermedad. Al parecer, los estudios de este investigador sólo demostraron la producción *in vitro* e *in vivo* de la CPE, cuyos signos y lesiones observadas en los escasos ensayos experimentales producidas por las cepas enterotoxigénicas inoculadas bien podrían ser consecuencias de otras toxinas capaces de ser producidas por el genotipo A (toxinas  $\alpha$  y  $\beta_2$ ).

El rol de la CPE en la producción de la enfermedad tampoco se sustenta en los resultados de ensayo de una vacuna experimental para prevenir la enterotoxemia de las alpacas en el campo. La vacuna, conteniendo cepas de *C. perfringens* tipos A, B, C y D con sus respectivas exotoxinas (anacultivo), viene demostrando una alta protección durante 6 años consecutivos en una empresa alpaquera del sur del Perú (Yaya y Rosadio, 2005). Estos anacultivos, por su naturaleza y composición durante el crecimiento y producción comercial, no poseen la CPE, pues esta toxina es sintetizada sólo durante la fase de esporulación de la bacteria, y la vacuna fue preparada a partir de cultivos jóvenes en condiciones inapropiadas para la esporulación. Los resultados alentadores de la vacuna tienden a indicar la participación de exotoxinas en el establecimiento de una respuesta inmunológica protectora contra la enterotoxemia de las alpacas. Por otro lado, la patogenicidad de la CPE no encaja con los cuadros de la enfermedad descritas, encontrándose esta más asociada a problemas de intoxicación alimentaria y diarreas (por alteración de la permeabilidad intestinal) profusas, esporádicas y autolimitantes en individuos inmunocompetentes (Sparks *et al.*, 2001); mientras los casos clásicos de enterotoxemia en alpacas muy pocas veces están asociados con diarreas.

La patogénesis de la enterotoxemia de las alpacas comenzará a elucidarse utilizando herramientas de alta tecnología como la usada en el presente estudio. En este trabajo, se reporta por primera vez en el Perú, la presencia de *C. perfringens* genotipo A subtipo  $\beta$ 2-toxigénico aislados de casos de enterotoxemia de alpacas. Este subtipo además de tener el gen *cpa* posee el gen *cpb2*, gen codificante de la recientemente identificada toxina  $\beta$ 2. El gen *cpb2* ha sido demostrado en el 27.7% (13/47) de los aislamientos de *C. perfringens* analizados, evidenciando la posible participación de la toxina  $\beta$ 2 en la etiopatogénesis de la enfermedad. Similares hallazgos han sido reportados por un grupo de investigadores estadounidenses, quienes detectaron la presencia del gen *cpb2* en 18.6% (8/43) de los *C. perfringens* aislados de alpacas con problemas entéricos (Bueschel *et al.*, 2003). La patogenicidad de esta toxina también se evidencia por la presencia del gen *cpb2* detectada en *C. perfringens* tipo A asociada con problemás entéricos en diferentes animales, principalmente en cerdos y caballos, encontrándose en cerca de 90% de *C. perfringens* aislados de casos de enteritis necrótica en lechones, en contraste a lo poco o nada encontrado en aislamientos de cerdos clínicamente sanos (Bueschel *et al.*, 2003, Garmory *et al.*, 2000), en 50 a 75% de los aislamientos de casos de tiflocolítis en potros (Herholz *et al.*, 1999, Garmory *et al.*, 2000), y en cuadros de enterotoxemia en terneros, cabras y venados (Manteca *et al.*, 2002; Embury-Hyatt *et al.*, 2005; Dray, 2004) y disentería hemorrágica en corderos (Gkiourtzidis *et al.*, 2001).

Interesantemente este subtipo  $\beta$ 2-toxigénico fue encontrado en 13/22 aislamientos provenientes de solamente uno de los cuatro centros de crianza alpaquera estudiados, indicando, tal vez, que este subtipo podría ser una patotipo más virulento del *C. perfringens*, circunscrita a una determinada área geográfica y asociada con brotes epizooticos severos observados en este fundo durante 4-5 años, a pesar de aplicar un adecuado sistema de manejo y control sanitario (Datos del fundo no publicados).

Las lesiones anátomo e histopatológicas observadas en los animales de los que se aislaron *C. perfringens* con genotipo A subtipo  $cp\bar{e}cpb2^+$  correspondieron en el 100% (10/10) a enteritis hemorrágica y en 33.3% (2/6) a enteritis hemorrágica y necrótica hemorrágica difusa aguda, respectivamente (ver anexo 2). Similares lesiones han sido observadas en inoculaciones experimentales de *C. perfringens* tipo A  $cpb2^+$  en intestinos ligados de terneros y conejos (Manteca *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004)

evidenciando cierto rol sinérgico entre las toxinas  $\alpha$  y  $\beta$  para producir lesiones de tipo necróticas y hemorrágicas en estos animales. Además, Baccinari *et al.* (2003), pudo demostrar la producción de la toxina  $\beta$  a nivel local en el intestino delgado y grueso de caballos con tiflocolitis mediante una prueba inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales monoespecíficos contra toxina  $\beta$ . Todos estos resultados sugieren la necesidad de elucidar el rol patogénico de la toxina  $\beta$  en la enterotoxemia de las alpacas pues al parecer participaría sola o en combinaciones de la toxina  $\alpha$  u otras por elucidarse en el desencadenamiento de cuadros fatales de la enfermedad.

El desarrollo de un cuadro enterotoxigénico en las alpacas no está bien entendidos, tal vez sea producto de la acción de una o más toxinas. La detección de *C. perfringens*, genotipo A sin poseer los genes *cpe* y *cpb2* (subtipo *cpe<sup>-</sup>cpb2<sup>-</sup>*), encontrada en el 70.2% (33/47) de los aislamientos provenientes de animales muertos por enterotoxemia tiende a indicar que solamente la presencia del gen *cpa* y su expresión (la toxina  $\alpha$ ) podría ser más que suficientes para la producción de enfermedad. Similares resultados han sido encontrados en estudios de genotipificación y subtipificación de aislamientos de *C. perfringens* de casos de enteritis necrótica en pollos y en cerdos (Engstrom *et al.*, 2003; Kalender y Ertas, 2005; Gholamiandekhordi *et al.*, 2005; Kanakaraj *et al.*, 1998), enterotoxemia en corderos y terneros (Kalender *et al.*, 2005; Songer, 1996; Dennisson *et al.*, 2005; Songer, 1996) y gastroenteritis hemorrágica en perros (Songer, 1996) sugiriendo que el gen *cpa* (toxina  $\alpha$ ) sería más que suficiente para que este genotipo desencadena cuadros patológicos.

El presente estudio también encontró en un 2.1% (1/47) al genotipo C proveniente de un caso patológico, apoyando a lo reportado por Moro (1971). Curiosamente, este genotipo, el cual posee el gen *cpb* codificante de la toxina  $\beta$ , fue el único subtipo enterotoxigénico encontrado en el estudio. Las lesiones provocadas por *C. perfringens* tipo C, descritos en terneros, son producto de la acción de la toxina  $\beta$  y responsable de necrosis y hemorragia en la mucosa intestinal (Niilo, 1986; Niilo, 1987; Niilo, 1988; Songer, 1996). Por lo que, las lesiones necrotizantes observadas en el intestino delgado del animal del cual se aisló este genotipo (severa enteritis necrótica no supurativa difusa aguda) podría ser consecuencia de la toxina  $\beta$  o de todas las toxinas (toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y

CPE). En este estudio no se logró aislar los genotipos B ni D como los descritos en Chile y en USA (Prehn *et al.*, 1999; Fowler, 1998).

Debe mencionarse que la simple detección de los diversos genes codificantes de toxinas (*cpa*, *cpb*, *etx*, *iap*, *cpe* y *cpb2*) por los diferentes toxinotipos clostridiales no implica necesariamente que estos se expresen (producción de toxinas). El éxito de su expresión depende de innumerables variables tales como: presencia de promotores, adecuados procesos de transcripción, traducción y ensamblaje de la proteína. Si bien es cierto que la demostración de la expresión génica no fue materia del presente estudio, se pudo demostrar cualitativamente, *in vitro*, la presencia de la actividad fosfolipasa de la toxina  $\alpha$  (gen *cpa*) que se traduce en la formación de hemólisis incompleta en agar sangre y presencia de reacción de Nagler en agar yema de huevo.

Por otro lado, la expresión del gen *cpb2*, el segundo gen mayormente encontrado en los aislamientos de *C. perfringens*, tampoco fue materia de la investigación, pero es un gen de alta probabilidad de expresión. La expresión del gen *cpb2* ha sido estudiada por varios investigadores demostrando que este gen se expresó en el 96.9% de aislamientos de *C. perfringens cpb2+* provenientes de casos de enteritis necrótica hemorrágica en cerdos y en el 50% de los aislamientos de *C. perfringens cpb2+* provenientes de casos de problemas entéricos de otras especies (Bueschel *et al.*, 2003, Waters *et al.*, 2003). Por lo que, se asume que el gen *cpb2* se haya expresado en la mayoría de los intestinos de los animales muertos por enterotoxemia, puesto que la toxina  $\beta_2$  tiene actividad necrotizante y hemorrágica sobre mucosa intestinal (Gibert *et al.*, 1997), lesiones intestinales observadas en los casos en donde se aislaron el *C. perfringens* con subtipo *cpe<sup>-</sup>cpb2<sup>+</sup>*.

Los resultados del presente estudio confirman al *C. perfringens* genotipo A como el tipo más prevalente en casos de enterotoxemia de alpacas y reportándose, por primera vez en el Perú, la presencia del gen *cpb2*. Sin embargo, se cuestiona la participación de la CPE como principal factor de virulencia de *C. perfringens* para el desarrollo de la enterotoxemia de las alpacas.

## VI. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR Múltiple demostró ser una técnica rápida y confiable para la determinación de genotipos y subtipos del *C. perfringens*.
2. El genotipo A y el subtipo *cpe-cpb2*- (no enterotoxigénico ni  $\beta$ 2-toxigénico) fue el genotipo y subtipo más frecuente de los *C. perfringens* aislados de alpacas muertas por enterotoxemia con porcentajes de 97.9 y 70.2 %, respectivamente.
3. El gen *cpb2*, gen codificante de la toxina  $\beta$ 2, es reportado por primera vez en el Perú, detectándose en 26.6% de los *C. perfringens* aislados de alpacas muertas por enterotoxemia.
4. Fue detectado sólo un aislamiento de *C. perfringens* (genotipo C) conteniendo el gen *cpe* codificante de la CPE, cuestionando su rol en la patogénia de la enterotoxemia de las alpacas.
5. Los resultados de este estudio apuntan básicamente a la toxina  $\alpha$ , y posiblemente a la toxina  $\beta$ 2, como los principales factores de virulencia asociados en la enterotoxemia de las alpacas.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios experimentales para elucidar el rol patogénico de la toxina  $\alpha$  en la enterotoxemia de las alpacas, así como, determinar si existen otros factores de virulencia del *C. perfringens*, aún no conocidos, que ayuden a llenar el gran vacío que existe de la patogénesis.
2. Elucidar la posible acción sinérgica de la eimeriosis y *C. perfringens* Genotipo A (subtipos *cpe-cpb2-* y *cpe-cpb2+*) en la presentación de la enterotoxemia de las alpacas.
3. Realizar estudios para determinar el grado de expresión del gen *cpb2*, y su participación como nuevo factor de virulencia en la etiopatogénesis de la enterotoxemia de las alpacas.
4. A razón de que en el presente estudio el gen *cpb2* sólo fue encontrado en uno de los cuatro centros de crianza alpaquera, es necesario determinar la prevalencia del gen *cpb2* en aislamientos de *C. perfringens* en los principales departamentos alpaqueros del Perú.
5. Desarrollar y/o mejorar las vacunas conteniendo las toxinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta_2$  para la prevención de la enterotoxemia de las alpacas.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Al-Khaldi, S. F.; D. Villanueva; V. Chizhikov. 2004.** Identification and characterization of *Clostridium perfringens* using single target DNA microarray chip. Int. J. Food Microbiol. 91: 289-296.
2. **Al-Khaldi, S. F.; K. M. Myers; A. Rasooly; V. Chizhikov. 2005.** Genotyping of *Clostridium perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization. Mol. Cel. Probes. Article in press.
3. **Ameghino, E.; J. De Martíni. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). UNMSM. Lima, Perú. p 71-80
4. **Archambault, M.; P. Bell-Rogers; H. Cai. 2002.** *Clostridium perfringens* genotyping, a valuable component of the diagnosis!. AHL Newsletter 6: 26-27.
5. **Bacciarini, L. N.; P. Boerlin; R. Straub; J. Frey; A. Gröne. 2003.** Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2 toxin in the gastrointestinal tract of horses. Vet. Pathol. 40: 376-381.
6. **Barach, J. T.; D. M. Adams; M. L. Speck. 1974.** Recovery of heat *Clostridium perfringens* type A spores on selective media. Appl. Microbiol. 28: 793-797.

7. **Baums, C. G.; U. Schotte; G. Amtsberg; R. Goethe. 2004.** Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 100: 11-16.
8. **Boujon, P.; M. Henzi; J-H. Penseyres; L. Belloy. 2005.** Enterotoxaemia involving  $\beta$ 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*). *Vet. Record* 156: 746-747.
9. **Brooks, G. F.; J. S. Butel; S.A. Morse. 1998.** *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick, y Aldergerg.* 16va ed. p 230-231. Editorial El Manual Moderno. México.
10. **Brown, T. 2000.** The polymerase chain reaction. En: *Essential molecular biology. A practical approach.* Vol. 2. 2da ed. p 89-120. Oxford University Press. Oxford.
11. **Brüggeman, H. 2005.** Genomics of clostridial pathogens: implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. *Current Opinion in Microbiology* 8: 601-605.
12. **Bruner, D.; J. Gillespie. 1966.** Hagan's infectious diseases of domestic animals. 5ta ed. p 373-375. Vail-bollou press. London.
13. **Brynstad, S.; B. Synstad; P. Granum. 1997.** The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology* 143: 2109-2115.
14. **Brynstad, S.; M. Sarker; B. McClane; P. Granum; J. Rood. 2001.** Enterotoxin plasmid from *Clostridium perfringens* is conjugative. *Infect. Immun.* 69: 3483-3487.
15. **Bueschel, D. M.; B. H. Jost; S. J. Billington; H. T. Trinh; J. G. Songer. 2003.** Prevalence of *cpb2*, encoding beta 2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* 94: 121-129.

16. **Bustinza, J. A. 2000.** Enfermedades de la alpaca. 2da ed. p 30-43. Impreso Universidad Nacional del Altiplano. Arequipa.
17. **Campos, D. de F. S.; M. R. Baccaro; A. M. Moreno; A. J. P. Ferreira; D. S. Doto; D. F. Murakami; L. T. Shinya. 2004.** *Clostridium perfringens* tipo A portadores do gene *cpb2* asociados à lesões em íleo de coelhos. Arq. Inst. Biol. São Paulo 71: 287-292.
18. **Carbajal, M. 1974.** Determinación de las causas de mortalidad en crías de alpaca en el departamento de Puno en las campañas ganaderas de 1972 y 1973. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional del Altiplano, Puno. 44 p.
19. **Carter, G. R. 1979.** Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 3ra ed. p 178-185. Library of Congress Cataloging in Publication Date. USA.
20. **Condemayta, Z.; E. Quispe. 2002.** Estudio de la mortalidad de llamas en puna seca y puna húmeda del departamento de Puno. Rev. Inv. En Camelidos Sudamericanos, Puno 10: 85-82.
21. **Cowan, S. T. 1974.** Manual for the identification of medical bacterial. 2da ed. p 66-69. Cambridge University Press. Great Britain.
22. **Cruickshank, R. 1965.** Medical microbiology. 11va ed. p 308-316. E. & S. Livingstone Limited. Great Britain.
23. **Dennison, A. C.; D. C. Van Metre; P. S. Morley; R. J. Callan; E. C. Plamplin; R. P. Ellis. 2005.** Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by *Clostridium perfringens* obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum. JAVMA 227: 132-138.

24. **Dray, T. 2004.** *Clostridium perfringens* type A and  $\beta$ 2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can. Vet. J.* 45: 251-253.
25. **Dushesnes, C.; J. Mainil. 2005.** Genus *Clostridium*. Scientific Booklets European Concerted Action QLK2-CT2001-01267. disponible en: <http://www.genusclostridium.net>.
26. **Ellis, R. P. 2006.** *Clostridium perfringens* enteritis. En: The complete alpaca book. p 464-467. E. Hoffman (ed). 2da ed. Bonny Doun Press. California.
27. **Embury-Hyatt, C. K.; G. Wobeser; E. Simko; M. R. Woodbury. 2005.** Investigation of a syndrome of sudden death, splenomegaly, and small intestinal hemorrhage in farmed deer. *Can. Vet. J.* 46: 702-708.
28. **Emswiler, B. S.; C. J. Pierson; A. W. Kotula. 1977.** Comparative study of two methods for detection of *Clostridium perfringens* in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 735-737.
29. **Engström, B. E.; C. Fermér; A. Lindberg; E. Saarinen; V. Baverud; A. Gunnarsson. 2003.** Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet. Microbiol.* 94: 225-235.
30. **Erlich, H.A.; N. Arnheim. 1992.** Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Ann. Rev. Genet.* 26: 479-506.
31. **Fowler, M. E. 1998.** Medicine and surgery of South American camelids. 2da ed. p 166-169. Iowa State University Press. Iowa.
32. **Garmory, H. S.; N. Chanter; N. P. French; D. Bueschel; J.G. Songer; R. W. Titball. 2000.** Occurrence of *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 124: 61-67.

33. **Garrity, G. M.; M. Winters; D. B. Searles. 2001.** Taxonomic outline of the prokaryotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2da ed. p 1-41. U.S.A.
  
34. **Gholamiandekhordi, A. R.; R. Ducatelle; M. Heyndrickx; F. Haesebrouck; F. V. Immerseel. 2005.** Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet. Microbiol.* Short communication.
  
35. **Gibert, M.; C. Jolivet-Reynaud; M. R. Popoff. 1997.** Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203: 65-73.
  
36. **Gijón, M. A.; D. M. Spencer; C. C. Leslie. 2000.** Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *Advan. Enzyme Regul.* 40: 255-268.
  
37. **Gillespie, J.; J. Timoney. 1981.** Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7ma ed. p 207-211. International Standart. U.S.A.
  
38. **Gkiourtzidis, K.; J. Frey; E. Bourtzi-Hatzopoulou; N. Iliadis; K. Sarris. 2001.** PCR detection and prevalence of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta_2$ -,  $\epsilon$ -,  $\iota$ - and enterotoxin genes in *Clostridium perfringens* isolated from lambs with clostridial dysentery. *Vet. Microbiol.* 82: 39-43.
  
39. **Hatheway, C. 1990.** Toxigenic clostridia. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 66-98.
  
40. **Herholz, C.; R. Miserez; J. Nicolet; J. Frey; M. Popoff; M. Gubert; H. Gerber; R. Straub. 1999.** Prevalence of  $\beta_2$ -toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. *J. Clin. Microbiol.* 37: 358-361.
  
41. **Innis, A. M. 1995.** PCR strategies. 2da ed. Academic Press, UK.
  
42. **Joclik, W. K.; H. P. Willett. 1991.** *Zinsser Microbiología*. 20va ed. p 861-871. Ed. Médica Veterinaria. Buenos Aires.

43. **Jost, B. H.; S. J. Billington; H. T. Trinh; D. M. Buesschel; J. G. Songer. 2005.** Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin. *Infect. Immun.* 73: 652-656.
44. **Kalender, H.; H. B. Ertas. 2005.** Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by polymerase chain reaction (PCR). *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 29: 847-851.
45. **Kalender, H.; H. B. Ertas; B. Ceninkaya; A. Muz; N. Aíslan; A. Kilic. 2005.** Typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Vet. Med-Czech.* 50: 439-442.
46. **Kanakaraj, R.; D. L. Harris; J. G. Songer; B. Bosworth. 1998.** Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and swine feed. *Vet. Microbiol.* 63: 29-38.
47. **Leguia, G.; E. Casas. 1999.** Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. 1ra ed. p 14-22. Editorial del Mar. Lima.
48. **Madigan, M. T.; J. M. Martinko; J. Parker. 2001.** Biología de los microorganismos. 8va ed. p 725-727. Prentice Hall. España.
49. **Manteca, C.; G. Daube; T. Jauniaux; A. Linden; V. Pirson; J. Detilleux; A. Ginter; P. Coppe; A. Kaeckenbeeck; J. G. Mainil. 2002.** A role for the *Clostridium perfringens*  $\beta$ 2 toxin in bovine enterotoxaemia?. *Vet. Microbiol.* 86: 191-202.
50. **McClane, B. A. 2000.** *Clostridium perfringens* enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol.* 8: 145-146.
51. **Melo, M.; G. Medina; C. Sánchez; Z. Condemayta; A. Soto. 1999.** Influencia del manejo de un brote de enterotoxemia en crías de alpacas del CE La Raya-UNA-Puno. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. p 138.

52. **Merchant, I. A.; R. A. Packer. 1961.** Veterinary bacteriology and virology. 6ta ed. p 492-493, 505-509. Library of Congress Catalog Card. Iowa.
53. **Miyamoto, K.; G. Chakrabarti; Y. Morino; B. McClane. 2002.** Organization of the plasmid *cpe* locus in *Clostridium perfringens* type A isolates. Infect. Immun. 70: 4261-4272.
54. **Miyamoto, K.; Q. Wen; B. McClane. 2004.** Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxigenic toxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. J. Clin. Microbiol. 42: 1552-1558.
55. **Moro, M. 1971.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA) UNMSM. Lima, Perú. p 9-14.
56. **Moro, M. 1987.** Enfermedades infecciosas de las alpacas. Diarrea bacilar o enterotoxemia de las crías de las alpacas. Rev. Camélidos Sudamericanos, Lima 4: 8-13.
57. **Nauerby, B.; K. Pedersen; M. Madsen. 2003.** Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. Vet. Microbiol. 94: 257-266.
58. **Nicolet, J. 1986.** Compendio de bacteriología médica veterinaria. 1ra ed. p 146-160. Ed. Acribia S.A. España.
59. **Niilo, L. 1986.** Enterotoxemic *Clostridium perfringens*. En: Pathogenesis of bacterial infections in animals. p 80-86. En: C. I. Gyles; C. O. Thoen. (ed) 1ra ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. Iowa.

60. **Niilo, L. 1987.** Toxigenic characteristic of *Clostridium perfringens* type C in enterotoxemia of domestic animals. *Can. J. Vet. Res.* 51: 224-228.
61. **Niilo, L. 1988.** *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia. *Can. Vet. J.* 29: 658-664.
62. **Oha, R. 1994.** Anatomía patológica de las diarreas infecciosas en crías de alpaca (*Lama pacos*) en la SAIS Aricoma Ltda.57. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional del Altiplano, Puno. 79 p.
63. **Olive, D. M.; P. Bean. 1999.** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1662-1669.
64. **Palacios. 2004.** Caracterización anatomopatológica de enteropatías causantes de mortalidad en crías de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM, Lima 164 p.
65. **Palacios, C.; L. Tabacchi; A. Chavera; T. Lopez; G. Santillán; N. Sandoval; D. Pezo; R. Perales. 2004.** Eimeriosis en crías de alpacas: Estudio anatomohistopatológico. *Rev. Inv. Vet. Perú* 15: 174-178.
66. **Palacios, C. A.; R. A. Perales; A. E. Chavera; M. T. Lopez; W. U. Braga; M. Moro. 2006.** *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Perú. *Vet. Rec.* 158: 344-345.
67. **Petit, L.; M. Gibert; M. Popoff. 1999.** *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 7: 104-110.
68. **Pezo, D.; E. Franco; W. García; V. Leyva. 1999.** Evaluación de una solución de antibióticos (ampicilina + sulfato de colistina) y consumo de calostro en la prevención neonatales en crías de alpacas. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. p 139.

69. **Prehn, N.; S. Saez; M. Arraigada. 1999.** Estudios microbiológicos y clínicos de enterotoxemia por *Clostridium perfringens* en camélidos sudamericanos. Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. p 140.
70. **Quinn, P.J.; B. K. Markey; M. E. Carter; W. J. Donnelly; F. L. Leonard. 2005.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. 1ra ed. p 101-114. Ed. Acribia S. A. Zaragoza.
71. **Ramírez, A.; D. Huamán; R. P. Ellis. 1985.** Enterotoxemia de la alpaca. Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Serie reporte técnico, Lima 63: 1-17.
72. **Ramírez, A. 1987.** Alpaca *Clostridium perfringens* type A enterotoxemia: Purification and assays of the enterotoxin. In partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. Colorado State University, Colorado. 201 p
73. **Ramírez, A. 1988.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller “Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Arequipa. p 153-163.
74. **Ramírez, A.; R. Ellis. 1988.** Nuevos conceptos sobre la enterotoxemia y colibacilosis en alpacas. Rev. Camélidos Sudamericanos, Lima 6: 9-17.
75. **Ramírez, A. 1989a.** Avances de la Investigación sobre enteritis e inmunidad neonatal en la alpaca. Curso taller “Resultados de investigación del programa de rumiantes menores (1980-1989). Programa colaborativo de apoyo a la investigación en rumiantes menores. Riobamba. p 183-191.
76. **Ramírez, A. 1989b.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. XII Reunión Científica Anual APPA. Simposio de Producción de alpacas y llamas. FMV-UNMSM, Lima p 85-101.

77. **Ramírez, A. 1990.** Aplicación de la enterotoxina de *Clostridium perfringens* tipo A en el diagnóstico y control de la enterotoxemia en camélidos sudamericanos. Avances sobre investigación en salud animal CSA. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Bol. Div. 33: 11-24.
78. **Ramírez, A.; E. Franco; D. Pezo; W. García. 1998.** Diagnóstico y control de enfermedades en CSA. Pub. Tec. FMV 34: 9-14.
79. **Rivera, C. A.; A. Ramírez. 1999.** Dinámica de excreción de *E. coli* y enterotoxina de *C. perfringens* asociado a pH fecal en neonatos de alpaca (0-30 días). Res. II Cong. Mun. sobre Camélidos. Cusco, Perú. p 134.
80. **Rood, J.; S. Cole. 1991.** Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev. 55: 621-648.
81. **Rood, J. 1998.** Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu. Rev. Microbiol. 52: 333-360.
82. **Rosadio, R. H.; E. F. Ameghino. 1994.** Coccidial infection in neonatal peruvian alpacas. Vet. Rec. 135: 459-460.
83. **Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2. 2da ed. p 14.6-14.20. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
84. **Sawires, Y. S.; J. G. Songer. 2005.** Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. Anaerobe 11: 262-272.
85. **Sawires, S. Y.; J. G. Songer. 2006.** *Clostridium perfringens*: Insight into virulence evolution and population structure. Anaerobe. 12: 23-43.

86. **Schalch, B.; L. Bader; H. Schau; R. Bergmann; A. Rometsch; G. Maydl; S. Kebler. 2003.** Molecular typing of *Clostridium perfringens* from a food-borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 41: 892-895.
87. **Schotte, U.; U. Truyen; H. Neubauer. 2004.** Significance of  $\beta$ 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors. *J. Vet. Med.* 51: 423-426.
88. **Shimizu, T.; K. Obtani; H. Hirakawa; K. Ohshima; A. Yamashita; T. Shiba; N. Ogasawara; M. Hattori; S. Kuhara; H. Hayashi. 2002.** Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *PNAS* 99: 996-1001.
89. **Smedley, J. G.; D. J. Fisher; S. Sayeed; G. Chakrabarti; B. A. McClane. 2004.** The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 152: 183-204.
90. **Solís, R. 1997.** Producción de camélidos sudamericanos. 1ra ed. p 230-232. Imprenta Rios. Pasco.
91. **Songer, J. G. 1996.** Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 216-234.
92. **Songer, J. G.; R. R. Meer. 1996.** Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe* 2: 197-203.
93. **Songer, J. G. 1997.** Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol.* 5: 156-161.

94. **Sparks, S. G.; R. J. Carman; M. R. Sarker; B. A. McClane. 2001.** Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J. Clin. Microbiol.* 39: 883-888.
95. **Stagnitta, P. V.; B. Micalizzi ; A. M. Stefanini de Guzmán. 2002.** Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. *Anaerobe.* 8: 253-258.
96. **Stevens, D. L.; A. E. Bryant. 2002.** The role of clostridial toxins in the pathogenesis of gas gangrene. *Clostridial Myonecrosis. CID* 35: 93-100.
97. **Takahashi, A.; M. Kondoh; A. Másuyama; M. Fujii; H. Mizuguchi; Y. Horiguchi; Y. Watanabe. 2005.** Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxina in its interaction with claudin-4. *J. Controlled Release* 108: 56-62.
98. **Tettelin, H.; D. Radune; S. Kasif; H. Khouri; S. L. Salaberg. 1999.** Optimized multiplex PCR: Efficiently closing a whole genome shotgun sequencing project. *Genomics* 62: 500-507.
99. **Titball, R. W.; C. E. Naylor; A. K. Basak. 1999.** The *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin. *Anaerobe* 5: 51-64.
100. **University of Kentucky. 2006.** Environmental conditions for pathogenic bacterial growth. <http://www-seafood.ucdavis.edu/Pubs/pathogen.htm>
101. **Waters, M.; A. Savoie; H. S. Garmory; D. Bueschel; M. R. Popoff; J. G. Songer; R. W. Titball; B. A. McClane; M. R. Sarker. 2003.** Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with gastrointestinal disease in piglets. *J. Clin. Microbiol.* 41: 3584-3591.

102. **Wen, Q.; K. Miyamoto; B. McClane. 2003.** Development of a duplex PCR genotyping assay for distinguishing *Clostridium perfringens* type A isolates carrying chromosomal enterotoxin (*cpe*) genes from those carrying plasmid-borne enterotoxina (*cpe*) genes. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1494-1498.
103. **Whitehead, C.; D. E. Anderson. 2005.** Neonatal diarrhea in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 61: 207-215.
104. **Willians, R. B. 2005.** Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology.* 34: 159-180.
105. **Yaya, K.; R. Rosadio. 2005.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 16: 49-55.
106. **Yoo, H. S.; S. U. Lee; K. Y. Park; Y. H. Park. 1997.** Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 35: 228-232.
107. **Zhao, Y.; S. B. Melville. 1998.** Identification and characterization of sporulation-dependent promoters upstream of the enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 180: 136-142.

## **IX. APÉNDICES**

**Apéndice 1:** Base de datos del total de animales muestreados muertos por enterotoxemia de los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

Nº	Código	Centro de Crianza <sup>2</sup>	Departamento	Especie	Raza	Edad	Sexo	Color	Signos clínicos <sup>3</sup>	Diagnostico
1	CAC 1	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Suri	4 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
2	CAC 2	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Hembra	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
3	CAC 3	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Macho	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
4	CAC 4	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad-O	Enterotoxemia
5	CAC 5	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Macho	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
6	CAC 6	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad -C	Enterotoxemia
7	CAC 7	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
8	CAC 8	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	Hembra	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
9	CAC 9	C.A.Ccaicco	Cusco	Alpaca	Huacaya	3 sem	Hembra	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
10	EEI 1	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Huacaya	2 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
11	EEI 2	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Huacaya	8 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
12	EEI 3	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Suri	4 sem.	Hembra	Café	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
13	EEI 4	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Huacaya	4 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
14	EEI 5	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Huacaya	6 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
15	EEI 6	E.E.IVITA	Cusco	Alpaca	Suri	4 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
16	CAP 1	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D. <sup>1</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
17	CAP 2	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
18	CAP 3	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
19	CAP 4	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
20	CAP 5	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
21	CAP 6	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
22	CAP 7	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
23	CAP 8	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
24	CAP 9	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia

Nº	Código	Centro de Crianza <sup>2</sup>	Departamento	Especie	Raza	Edad	Sexo	Color	Signos clínicos <sup>3</sup>	Diagnostico
25	CAP 10	C.A.Picotani	Puno	Alpaca	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
26	FAP 1	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	1 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
27	FAP 2	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	N.D.	LF	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
28	FAP 3	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	1 sem	N.D.	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
29	FAP 4	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	1 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
30	FAP 5	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	N.D.	LF	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
31	FAP 6	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	Macho	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
32	FAP 7	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	8 sem	Macho	Café	Muerte súbita	Enterotoxemia
33	FAP 8	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	N.D.	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
34	FAP 9	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	8 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
35	FAP 10	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad -O	Enterotoxemia
36	FAP 11	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Suri	2 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
37	FAP 12	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
38	FAP 13	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	4 sem	Macho	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
39	FAP 14	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	N.D.	Hembra	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
40	FAP 15	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	3 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
41	FAP 16	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	8 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
42	FAP 17	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Suri	6 sem	Macho	Blanco	Muerte súbita	Enterotoxemia
43	FAP 18	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	3 sem	N.D.	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
44	FAP 19	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	2 sem	Macho	Blanco	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
45	FAP 20	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	N.D.	N.D.	N.D.	P-D-I-Ad	Enterotoxemia
46	FAP 21	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia
47	FAP 22	F.A.Privado	Puno	Alpaca	Huacaya	N.D.	N.D.	N.D.	Muerte súbita	Enterotoxemia

(1) N.D.=No Determinado; (2) C.A.=Comunidad alpaquera, E.E.=Estación experimental, F.A.=Fundo Alpaquero; (3) P=postración, D=decaimiento, I=inanición, Ad=Abdomen distendido, O=opistotono, C=convulsión.

**Apéndice 2:** Lesiones anatomopatológica e histopatológicas hallados en los animales muestreados muertos por enterotoxemia en los departamentos de Cusco y Puno durante el año 2005.

N°	Código	C.C. <sup>1</sup>	LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS							LESIONES HISTOPATOLOGICAS	
			Intestino <sup>2</sup>	Estomago <sup>3</sup>	Timo <sup>3</sup>	Bazo <sup>3</sup>	Higado <sup>3</sup>	Riñon <sup>3</sup>	Asociado a :	Intestino <sup>4</sup>	Eimeria
1	CAC 1	B	M.E.N.H.	C	C	A.N.	C	A.N.	-	S.E.N.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (+)
2	CAC 2	B	M.E.H.	H	C	A.N.	C	C	-	S.E.N.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (++)
3	CAC 3	B	M.C.I	A.N. <sup>6</sup>	C	A.N.	C	C	-	N.D.	N.D.
4	CAC 4	B	M.E.H.	A.N.	C	C	C	A.N.	-	S.E.N.D.A.	.
5	CAC 5	B	M.E.H.	C	C	A.N.	C	C	-	S.E.N.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (+)
6	CAC 6	B	M.E.H.	A.N.	C	A.N.	C	A.N.	-	M.E.N.H.D.A	-
7	CAC 7	B	M.E.N.H.	C	C	A.N.	C	C	-	N.D.	N.D.
8	CAC 8	B	M.E.N.H.	C – H	C	A.N.	C	C	-	N.D.	N.D.
9	CAC 9	B	M.E.N.H.	C	C	A.N.	C	C	Neumonía	S.E.N.n S.D.A.	-
10	EEI 1	B	M.E.H.	A.N.	A.N.	A.N.	A.N.	A.N.	-	S.E.N.D.A.	-
11	EEI 2	B	M.C.I.	C	H. peteq.	A.N.	C	A.N.	-	S.E.N.nS.D.A.	-
12	EEI 3	B	M.E.N.H.	A.N.	A.N.	C	C	A.N.	-	N.D.	N.D.
13	EEI 4	R	M.E.H.	A.N.	C	A.N.	C	A.N.	-	S.E.N.H.D.A.	-
14	EEI 5	R	M.E.H.	A.N.	H. peteq	A.N.	C	A.N.	-	S.E.N.nS.D.A	-
15	EEI 6	M	M.E.H.	A.N.	H. peteq	A.N.	A.N.	C	-	N.D.	N.D.
16	CAP 1	N.D. <sup>5</sup>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17	CAP 2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
18	CAP 3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
19	CAP 4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	CAP 5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
21	CAP 6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
22	CAP 7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
23	CAP 8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
24	CAP 9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N°	Código	C.C. <sup>1</sup>	LESIONES ANATOMOPATOLÓGICAS							LESIONES HISTOPATOLÓGICAS	
			Intestino <sup>2</sup>	Estomago <sup>3</sup>	Timo <sup>3</sup>	Bazo <sup>3</sup>	Higado <sup>3</sup>	Riñón <sup>3</sup>	Asociado a :	Intestino <sup>4</sup>	Eimeria
25	CAP 10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
26	FAP 1	R	M.E.H.	A.N.	A.N.	A.N.	A.N.	A.N.	Neumonía	N.D.	N.D.
27	FAP 2	R	L.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	A.N.	C	Neumonía	N.D.	N.D.
28	FAP 3	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
29	FAP 4	R	M.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	C	C	Neumonía	S.E.N.S.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (+)
30	FAP 5	B	M.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
31	FAP 6	B	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	-	S.E.N.H.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (+)
32	FAP 7	B	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
33	FAP 8	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	S.E.H.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (+)
34	FAP 9	B	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	S.E.N.S.D.A.	<i>E. macusaniensis</i> (++)
35	FAP 10	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
36	FAP 11	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	-	N.D.	N.D.
37	FAP 12	R	M.E.H.	C – H	H. peteq	C	C	C	Neumonía	M.E.S.D.A.	-
38	FAP 13	B	M.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
39	FAP 14	B	L.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	S.E.N.D.A.	-
40	FAP 15	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
41	FAP 16	B	M.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
42	FAP 17	R	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
43	FAP 18	B	M.E.H.	C – H	A.N.	A.N.	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
44	FAP 19	B	M.E.H.	C – H	A.N.	C	C	C	Neumonía	N.D.	N.D.
45	FAP 20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
46	FAP 21	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
47	FAP 22	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

(1) C.C.=condicion corporal; B=Bueno, R=Regular, M=Malo. (2) L.E.H.=Leve enteritis hemorrágica; M.E.H.=Moderada enteritis hemorrágica; M.E.N.H.=Moderada enteritis necrótica hemorrágica; M.C.I.=Moderada congestión intestinal. (3)C=Congestionado; H=Hemorrágico; H. peteq.=Hemorragias petequiales. (4) S.E.N.D.A.=Severa enteritis necrótica difusa aguda; M.E.N.H.D.A.=Moderada enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda; S.E.N.H.D.A.=Severa enteritis necrótica hemorrágica difusa aguda; S.E.N..n.S.D.A.=Severa enteritis necrótica no supurativa difusa aguda; M.E.N.S.D.A.=Moderada enteritis necrótica supurativa difusa aguda; S.E.N.S.D.A.=Severa enteritis necrótica supurativa difusa aguda; S.E..H.D.A.=Severa enteritis hemorrágica difusa aguda. (5)N.D.=No Determinado. (6) A.N.=Aparentemente Normal.